

ZUR ÖDEMPROTEKTIVEN WIRKUNG VON
TRIMETHYLHESPERIDINCHALCON,
RUSCUS-EXTRAKT UND RUSCOGENIN AUF DAS
ETACRYNSÄUREÖDEM AM HINTERLAUF DER
NARKOTISIERTEN KATZE

JOSEF NIEBERLE

1985

*Oss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0055

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Forth

Zur ödemprotektiven Wirkung von
Trimethylhesperidin-chalcon, Ruscus-Extrakt und
Ruscogenin auf das Etacrynsäureödem am
Hinterlauf der narkotisierten Katze

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Nieberle

aus
Buchloe

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Felix

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 10. 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
- Stand des Wissens	3
- Bemerkungen zur Ödementstehung	5
- Übersicht über Mechanismen der antiödematösen Wirkung bei Flavonoiden, Steroidsaponinen und deren Derivaten	12
2. Methodik	21
2.1 Ödemmodell	27
2.2 Angewandte Substanzen und Pharmaka	32
2.3 Kombinierte Anwendung von TMHC und Ruscus-Extrakt	36
2.4 Statistische Methoden	36
2.5 Abkürzungen	36
2.6 Diskussion der Methode	37
3. Ergebnisse	
3.1 Kontrollen	42
3.1.1 Propandiol-1,2 als Lösungsmittel der Chloralose	43
3.1.2 Auswirkung der Etacrynsäureperfusion	43
3.2 Dynamik der Ödementstehung	47
3.3 Verumversuche, intravenöse Anwendung	53
3.3.1 TMHC, 10, 20 und 50 mg/kg	53
3.3.2 Ruscus-Extrakt, 10 und 20 mg/kg	60
3.3.3 Ruscogenin, 4 mg/kg	62
3.4 Verumversuche, intravenös Kombinierte Anwendung von TMHC und Ruscus-Extrakt	68

	Seite
3.5 Verumversuche, orale Anwendung	76
3.5.1 TMHC, 100 mg/kg und 200 mg/kg	76
3.5.2 Ruscus-Extrakt, 200 mg/kg und 400 mg/kg	81
3.5.3 Ruscogenin, 20 mg/kg und 80 mg/kg	84
3.5.4 Vergleich und Zusammenfassung:	
Ruscus - Ruscogenin, oral	88
3.5.5 Vergleich Ruscogenin i.v. - Ruscogenin oral	88
3.6 Verumversuche, orale Anwendung	
Kombination von TMHC und Ruscus-Extrakt	90
3.6.1 Kombination und Einzelsubstanzen, oral - Vergleich	91
3.6.2 intravenöse und orale Applikation von TMHC und Ruscus-Extrakt - Vergleich	93
4. Diskussion der Ergebnisse	95
4.1 Einflüsse der Etacrynsäure	96
4.2 Dynamik der Ödenentstehung	98
4.3 Auswirkung von TMHC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin auf Kreislaufparameter	102
4.4 Auswirkung von TMHC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin auf das Etacrynsäureödem	107
4.5 Kombination von Flavonoiden und Saponinen	115
4.6 Ruscus-Extrakt im Vergleich mit Ruscogenin	119
4.7 Resorption von Flavonoiden und Saponinen	120
5. Zusammenfassung	123
6. Literaturverzeichnis	125

1. E I N L E I T U N G

Neben chirurgischen und physikalischen Methoden ist die medikamentöse Therapie bei Beschwerden des "dicken Beines" vielgeübte Praxis. Als Ursachen dieses Beschwerdekompleses gelten das postthrombotische Syndrom, die chronische Veneninsuffizienz und das lymphatische Ödem. Entsprechend vielfältig sind die Möglichkeiten, Ansatzpunkte für eine pharmakologische Therapie zu suchen. Wesentliche Voraussetzung, um entzündliche und fibrotisch-sklerosierende Folgezustände im Gewebe zu verhindern, ist, Ödeme zu beseitigen und zu unterbinden. Denn in Begleitung des Ödems, vor allem des eiweißreichen, entstehen erhebliche Gewebeschäden durch chronische Entzündung (Schneider, Fischer 1969, Fischer et al. 1975, Casley-Smith 1982, Fischer 1983). Ein derartiges Ödem entsteht, wenn venös oder lymphatisch der Rücktransport aus der Peripherie über längere Zeit behindert oder unterbunden ist. Die Behinderung des Rücktransportes führt im Sinne einer Rückwärtsdekompensation zu einer mangelhaften Entsorgung des Gewebes und schließlich zu massiven Störungen des Gewebestoffwechsels (Fischer 1978). Die auftretende Hypoxie ist also nicht durch arterielle Minderperfusion hervorgerufen. Das ist zu bedenken, wenn gefordert wird, eine chronische Veneninsuffizienz durch kreislaufaktive Pharmaka zu beheben. Durch primäre Erhöhung des Perfusionsdruckes würde bei schon maximal dilatierten Kapillaren (Hypoxie) die Nettofiltration gesteigert, da die venöse Abflußbehinderung ja nicht beseitigt wäre.

Klinisch imponiert die Entsorgungsstörung der Peripherie zuerst als Ödem. Allerdings ist nicht nur der Wasserhaushalt gestört, sondern weitere Stoffwechselstörungen sind letztlich für die Ausbildung von sekundären und tertiären Veränderungen an der Epidermis, Kutis und Subkutis verantwortlich (Fischer 1978).

Das Ödem tritt also als Begleiterscheinung und Indikator anderer Störungen auf und ist klinisch anfangs der auffälligste Parameter. Außerdem ist über ihn die Wirksamkeit z. B. medikamentöser Therapie relativ gut nachweis- und meßbar (Brunner et al. 1970).

Demzufolge ist es nötig, Ödeme zu verhindern, wenn man entzündliche und fibrotische Veränderungen vermeiden will. Hierbei sind die für eine Reihe von Pharmaka pflanzlichen Ursprungs nachgewiesenen Stoffwechselwirkungen bedeutsam. Dazu zählen auch die in dieser Arbeit untersuchte Substanz Trimethylhesperidinhalcon (= TMHC), weiter ein Extrakt aus

Wurzeln von *Ruscus aculeatus* Liliaceae-Asparagoideae, des Mäusedorns, und Ruscogenin, ein Steroidsapogenin dieses Extraktes. TMIC ist ein halbsynthetisches Flavonoid vom Grundtyp der Benzo-Pyrone, wovon die O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside wohl die (wissenschaftlich) bekanntesten Vertreter sind. Eine Übersicht über die mannigfaltigen Effekte der Flavonoide bietet Böhm (1967). Das TMIC im besonderen soll die Kapillarpermeabilität herabsetzen (Charlier et al. 1963, Seidenberger 1974, Merlen, Coget 1975, Tarayre, Laressergues 1975, Neumann-Mangoldt 1979). Nach Gábor (1972) lassen sich damit Ödeme reduzieren. Auch die erhöhte Kapillarresistenz nach TMIC (Gábor 1968, 1970) wirke in diese Richtung. Rudofsky, Nobbe (1982) konnten nach TMIC-Gabe am Menschen eine erniedrigte Venenkapazität feststellen. Sie leiteten daraus einen venentonisierenden Einfluß ab. Dem widerspricht Felix (1983/b), der bei Flavonoiden und bei TMIC im besonderen keine Erhöhung des venösen Tonus nachweisen konnte. Über eine verstärkte Blutzirkulation auf der Ebene der Endstrombahn mit einer gesteigerten Flußrate in Arterien und Kapillaren wußte Coget (1983) im Zusammenhang mit TMIC zu berichten. Tarayre, Laressergues (1975) beschreiben eine entzündungshemmende Wirkung des TMIC, die durch eine veränderte Kapillarpermeabilität erzielt werde.

Dem Extrakt aus *Ruscus aculeatus* wird ebenfalls ein antiödematöser Effekt zugesprochen (Übersicht bei Müller, 1973). Zusätzlich konnten Coget, Merlen (1980) und Coget (1983) nach Applikation dieses Extraktes eine erhöhte Erythrocyten-Fließgeschwindigkeit, eine bessere Füllung arterieller Gefäße und das Öffnen von zunächst unsichtbaren Kapillaren erkennen. Ein besonderes Gewicht wurde bei Untersuchungen mit *Ruscus*-Extrakt auf einen möglichen gefäßtonisierenden Einfluß gelegt, nachdem Moscarella (1953) an isolierten Gefäßen eine spezifische Tonisierung der Venen beobachtet hatte. Dies wurde vor allem in neueren Arbeiten (Tarayre, Laressergues 1976) wieder aufgegriffen und Marcelon, Vanhoutte (1983) und Marcelon et al. (1983) sowie Laressergues, Vilain (1983) führen den ebenfalls nachgewiesenen tonisierenden Effekt an Venen auf eine Freisetzung von Noradrenalin und auf eine direkte Aktivierung postsynaptischer alpha-Adrenorezeptoren (Marcelon et al. 1983) zurück.

Ruscogenin ist ein Steroidsapogenin, das 1955 von Sannie und Lapin aus dem *Ruscus*-Extrakt isoliert werden konnte. Ihm werden vasokonstriktive Eigenschaften und ein hemmender Einfluß auf die Kapillarpermeabilität nachgesagt (Capra 1972, Seidenberger et al. 1974).

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei Wirkungen dieser "Venopharmaka" untersucht werden, die Venentonisierung und eine antiexsudative Wirkung. Methodisch bedingt lag das Hauptgewicht der Untersuchungen auf letzterem, wobei der transkapilläre Flüssigkeitsaustausch als Meßgröße herangezogen wurde. Es ging darum, den pathologisch erhöhten Einstrom von Flüssigkeit ins Interstitium, d. h. die Entwicklung eines Ödems, im Tierversuch zu verhindern oder zumindest abzuschwächen. Weiterhin interessierte die Unspezifität des protektiven Effektes: Unspezifisch kann dieser zum einen gegenüber der auslösenden Noxe, zum anderen gegenüber der zu schützenden Struktur sein. Bei den meisten bisherigen Ödemmodellen werden Ödeme durch entzündliche Reaktionen ausgelöst. Pharmaka mit unspezifischer ödemprotektiver Wirkung sollten auch gegen nicht-entzündliche Prozesse, die zum Endothelschaden führen, wirksam sein. Aus diesem Grund wählten wir als Noxe die Etacrynsäure an, eine Substanz, von der wir annahmen, daß sie keine Entzündung hervorruft. Dadurch sollte bei der protektiven Wirkung obiger Pharmaka eine antiphlogistische Komponente ausgeschlossen werden. Inzwischen wurde von Hammersen und Hammersen (1983) nachgewiesen, daß die morphologischen Endothelveränderungen, ausgelöst durch Etacrynsäureperfusion am Katzenhinterlauf, nicht auf entzündlichen Reaktionen beruhen, sondern Ergebnis direkter Schädigung seien. Biochemische Untersuchungen von Yanase et al. (1983) liefern dafür ebenfalls Hinweise, indem sie aufzeigen, daß durch Etacrynsäure der Energiestoffwechsel von Mitochondrien blockiert werde.

Stand des Wissens

In unseren Versuchen am Hinterlauf der Katze wurde die Etacrynsäure intraarteriell appliziert, um einen Endothelschaden zu erzeugen. Diese Endothelaffektion führte in Haut und Muskel zu einem massiven eiweißreichen Ödem.

Die Substanzen TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin sollten dieses ganz oder teilweise abschwächen. Zur Beurteilung ihrer protektiven Wirkung wurde in Haut- und Muskelgewebe gesondert der Gehalt an markiertem Plasmaprotein und an Flüssigkeit bestimmt. Besondere Aufmerksamkeit galt der Frage, ob die Pharmaka sowohl nach intravenöser wie nach oraler Applikation wirksam sind. Zwar ist sowohl für TMIC wie für Ruscus-Extrakt die Resorption nach oraler Zufuhr nachgewiesen (Chanal et al. 1981, Chanal et al. 1982), jedoch lagen die Resorptionsquoten zwischen 5% und 10%. Zum zweiten ist bekannt, daß TMIC und Teile des Ruscus-Extraktes sehr gut wasserlöslich sind. Aufgrund pharmako-

kinetischer Tatsachen lassen sich für fettunlösliche Substanzen mit Molekulargewicht >400 kaum relevante Resorptionsquoten erwarten, es sei denn, es wirkten aktive Mechanismen, um die Darmmucosa überwinden zu helfen. Noch dazu wird der geringe Teil, der resorbiert wird, in den enterohepatischen Kreislauf eingeschleust. Letztendlich werden die Mengen, die dennoch in den großen Kreislauf gelangen, wegen der guten Wasserlöslichkeit rasch renal wieder ausgeschieden, wofür die sehr kurze Plasmahalbwertszeit dieser Stoffe von etwa 1/2 - 2 Stunden spricht. Trotz dieser ungünstigen Voraussetzungen konnten mit Dosierungen, die diese niedrige Resorptionsquote berücksichtigten, auch nach oraler Applikation obiger Substanzen signifikante Ergebnisse erzielt werden. Aus den benötigten Dosismengen waren Rückschlüsse auf das Ausmaß der enteralen Resorption der jeweiligen Pharmaka möglich.

Von einer kombinierten Anwendung aus TMIC und Ruscus-Extrakt wurde ein besonders wirksamer ödemprotektiver Einfluß erwartet, da theoretisch eine Summation der unterschiedlichen Wirkansätze der Einzelsubstanzen denkbar erscheint. Auch dies wurde nach intravenöser und nach oraler Applikation geprüft.

Diese Fragestellung war auch Gegenstand zahlreicher Arbeiten auf diesem Gebiet (Kappenberg 1972, Tarayre u. Lauressergues 1976, Coget u. Merlen 1980, Klemm 1981, Lauressergues u. Vilain 1983, Thebault u. Blatrix 1983, Coget 1983). Chanal et al. (1981) fanden, daß die Kombination aus TMIC und Ruscus-Extrakt im Phlebodril^R zu einer erhöhten Resorptionsquote der Einzelpharmaka führte. Lauressergues (1970) konnte mit dieser Kombination keinen additiven permeabilitätssenkenden Effekt erzielen. Demgegenüber bestätigten Felix (1983/b) und Felix et al. (1983/b) den theoretisch geforderten additiven Effekt der Einzelsubstanzen in kombinierter Anwendung.

Rudofsky u. Nobbe (1982) und Sentou (1983) prüften TMIC und Ruscus-Extrakt in Form des Kombinationspräparates Phlebodril^R im Rahmen von Doppelblindstudien am Menschen. Sie berichteten von einer signifikanten Abnahme der Kapillarpermeabilität und einer Steigerung des Venentonus.

Ruscogenin wurde hinsichtlich der Frage untersucht, ob die erwiesene Wirkung des Gesamtextraktes gegen Ödeme auf diese Einzelkomponente zurückgeführt werden kann. Andernfalls wäre anzunehmen, daß noch andere Bestandteile des Ruscus-Extraktes antiödematös wirksam sind.

Der vieldiskutierte vasoaktive Effekt von TMIC und Ruscus-Extrakt sowie

von Ruscogenin wurde nach intravenöser Injektion geprüft. Sowohl dieser Effekt als auch die ödemprotektive Potenz der Pharmaka wurden nach unterschiedlichen Dosierungen getestet und wir versuchten, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung darzustellen.

Bemerkungen zur Ödementstehung

Für die Ödementstehung sind Strukturen des Endstromgebietes, Kapillaren, Venulen und Lymphgefäße von Bedeutung. Sie erlauben morphologisch und physiologisch einen Durchtritt von Flüssigkeit und Makromolekülen ins Interstitium. Ein Ödem entsteht, wenn mehr Flüssigkeit ins Gewebe übertritt als aus ihm abtransportiert wird. Dieses Ungleichgewicht kann auf vermehrtem Einstrom bei unveränderten Abstrombedingungen oder auf gehemmtem Abfluß beruhen.

Zu vermehrtem Einstrom führt einmal ein erhöhter arterieller Druck bei unveränderter Morphe der Gefäßwand: Aus dieser Störung würde ein Ödem resultieren, das eiweißarm ist und als hämodynamisches Ödem bezeichnet wird.

Zum anderen führt eine erhöhte Permeabilität infolge gestörter Gefäßwandstruktur ebenfalls zu einem vermehrten Einstrom von Flüssigkeit ins Gewebe. In diesem Fall würde man ein eiweißreiches Ödem erhalten. Als Abflußhindernisse, die zum interstitiellen Ödem führen können, wären Beeinträchtigungen des venösen und lymphatischen Transportes zu nennen (Leu 1971, Klüken 1971, Casley-Smith, Piller 1973).

Kapillarwandstruktur. Seit Pappenheimer (1953) aufgrund spezieller Permeabilitätsuntersuchungen die Existenz sogenannter small pores und large pores gefordert hatte, wird vor allem in der Ära der Elektronenmikroskopie nach morphologischen Äquivalenten für die physiologisch geforderten Durchtrittsstellen durch Kapillar- und Venulenwand gesucht. Elektronenoptisch definierbar werden als Durchtrittsstellen des solvent drag-transportes durch Gefäßmembranen bzw. als Schranken dafür folgende Strukturen diskutiert: (Bundgaard 1980)

- Porentheorie von Pappenheimer
- Interendotheliale Fugen
- transzelluläre Kanäle
- Vesikel
- Fenestrae
- Basalmembran

Lange Zeit wurde die Ansicht vertreten, daß das System der großen Poren sein morphologisches Korrelat in den endothelialen Vesikeln habe und das System der "kleinen Poren" mit den gap-junctions im Bereich von Endothelfugen beschrieben werden könnte (Hammersen 1982). Palade et al. (1979) fordern, daß sowohl die "großen" als auch die "kleinen Poren" in Gestalt transendothelialer Kanäle repräsentiert seien. Dazu existiere noch ein vesikulärer Transport, wobei durch Vermehrung der Fusionsrate von Vesikeln transendotheliale Kanäle gebildet würden, so daß je nach lokalem Bedarf eine vesikuläre "Transzytose" in eine "Convective transcytosis" übergehen könne und umgekehrt (Simionescu 1979). Jedoch haben zahlreiche Nachuntersuchungen derartige Kanäle nicht bestätigen können (Casley-Smith 1979, Bundgaard 1980, Hammersen 1982). Hammersen (1982) weist darauf hin, daß transendotheliale Kanäle in normalen Endothelien eine Ausnahme darstellen und ihr Auftreten "Ausdruck einer gestörten Endothelstruktur im Zusammenhang gesteigerter Permeabilität" (siehe dort) sei. Ob sogenannte Fenestrae ein morphologisches Äquivalent des Systems der "großen Poren" sind, ist unbestimmt (Bundgaard 1980). Sie haben einen Durchmesser von 400 - 600 Å und sind durch ein Diaphragma verschlossen, das aus Proteoglykanen aufgebaut ist. Zu finden sind Fenestrae vorwiegend in sehr dünnen Endothelien, wie sie in Verbindung mit sezernierenden Epithelien vorkommen (Nierentubuli, Drüsenepithel, Plexus choroideus).

Die Funktion der Basalmembran als Barriere des Substrattransportes durch Endothelzellen wird in neueren Arbeiten in Frage gestellt. Sie besteht aus feinstem Filzwerk, das in eine mukopolysaccharidreiche Matrix eingebettet ist. An Kapillaren vom "kontinuierlichen Typ", wie er bei Säugetieren u. a. in der Herz-, Skelett- und in der glatten Muskulatur vorkommt, bildet die Basalmembran eine durchgehende Schicht. Wenn sie eine Barriere ist, dann nur für extrem große Moleküle. Die Meerrettichperoxidase etwa und Substanzen mit ähnlich großer Molekülgröße können durch die Basalmembran bei Vorliegen eines geschlossenen Endothels praktisch ungehindert hindurchtreten (Hammersen 1973).

Transkapillärer Stoffaustausch. Neueste Theorien über Morphologie und Physiologie des transendothelialen Substratflusses behalten zwar die Grundideen von kleinen und großen Poren bei, allerdings in modifizierter Form. Danach dienen die äußerst schmalen interendothelialen

Spalten mit einer im allgemeinen konstanten Breite von 200 Å (Hammersen 1973) und den gap-junctions oder maculae occludentes (Karnovsky 1968) (Anheftungsbezirke) als Durchtrittspforten für Wasser und wasserlösliche Kleinmoleküle (Frömter 1972, Bundgaard 1980, Hammersen 1982). Dieser Weg des Flüssigkeitsstroms wird auch als morphologisches Substrat der Ödembildung angesehen, da bereits eine geringe Verbreiterung der Endothelspalte zu einem massiven Flüssigkeitsstrom ins Interstitium führt (Hammersen 1982).

Das "small pore system" bildet die Durchtrittsstelle für die freie Diffusion von Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von ca. 10 000. Als praktisch unüberwindbar gelten diese "Poren" für Substanzen mit einem Molekulargewicht von größer als 90 000.

Der langsamere Austausch von Makromolekülen erfolgt über das sogenannte "large pore system". Das morphologische Substrat dafür sollen nach überwiegender Ansicht die mikropinozytotischen Bläschen sein. Die Vorstellung über die Durchschleusung dieser Vesikel durch die Zelle geht auf Moore und Ruska (1957) zurück. Infolge Widersprüchlichkeiten zwischen physiologischen Meßdaten über Selektivität und Geschwindigkeit des transendothelialen Transportes makromolekularer Substanzen und den Transportzeiten, die auf morphologischen Arbeiten basierten, erfuhr die Uridee der vesikulären Zytopenmpsis beträchtliche Modifizierungen (Johansson 1978, Clough et al. 1979, 1981, Frokjaer-Jensen et al. 1979, Frokjaer-Jensen 1980). Aufgrund dieser Untersuchungen muß man annehmen, daß die Vesikel überwiegend (mehr als 99%) stabil im Zytoplasma liegen und Einstülpungen des luminalen und basalen Plasmalemmes darstellen. Nach Frokjaer-Jensen (1980) können durch Vesikelfusionen Kommunikationsorte entstehen, die als Äquivalent der "großen Poren" angesehen werden (Hammersen 1982). Durch Intensivierung des Verschmelzungsprozesses dieser Invaginationen kann die Permeation für Makromoleküle erhöht werden. Dies würde bedeuten, daß eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle im wesentlichen auf eine größere Anzahl von Vesikeln zurückzuführen wäre.

In einem neuen, von Michel (1979, 1980) entwickelten Kapillarmodell, wird der die Endothelzellen bedeckenden Glykokalixschicht, bestehend aus einem gelartigen Aggregat von Proteoglykanmolekülen, eine wesentliche Bedeutung zugemessen. Proteoglykane sind Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von 0,5 bis 2×10^6 Dalton. Sie werden von

den Endothelzellen synthetisiert und als Strukturelemente an den Extrazellulärraum abgegeben. Ihr Aufbau gliedert sich in ein zentrales Proteinfilament, an das mehrere Seitenketten von Glukosaminoglykanen angeheftet sind. Diese Schicht stelle eine wesentliche Diffusionsbarriere auf der luminalen Endothelzellmembran dar, zumal die luminalen Vesikel nach diesen Untersuchungen keine direkt offene Verbindung zur Gefäßlichtung haben (Michel 1980). Der Vesikelinhalt wird durch Fusion an andere Bläschen weitergereicht. Bundgaard (1980) beschreibt diesen Vorgang mit "Diffusion in einem System aus Cysternen". Die zufallsmäßige Bildung transendothelialer Kanäle wird nicht ausgeschlossen.

Unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten und hohe Selektivität der Permeationsraten für bestimmte Makromoleküle (Lit. bei Bundgaard 1980) werden mit der Barrierefunktion der Glykokalixschicht (Buddecke 1976) und der interzellulären Zementschicht (Oschmann 1978) aus Hyaluronsäure begründet.

Dieser These folgend wäre die Permeabilität von Endothelien im wesentlichen abhängig von der eigenen Syntheseleistung an Glukosaminoglykanen, den Bausteinen der Glykokalixschicht über dem luminalen Plasmalem. Da auch Glycoproteine an diese Glukosaminoglykane gebunden sind, wird für die Funktionsfähigkeit der Endothelien als Stoffaustauschgrenzen eine ungestörte Synthese an Proteinen Voraussetzung sein. Befunde, wonach Störungen in der Proteinbiosynthese mit gesteigerter Permeabilität verbunden sein können, werden so plausibel.

Pathophysiologie der Ödementstehung. Von den physiologischen Mechanismen des transendothelialen Volumen- und Stoffaustausches lassen sich die wichtigsten Störungen ableiten, die zu Substrat- und Flüssigkeitsansammlung im Interstitium, zur Ödembildung, führen. Nach dem klassischen Modell von Starling wird die Flüssigkeitsverteilung zwischen Gefäßraum und Interstitium durch den kolloidosmotischen Druck im Plasma beherrscht. Abhängig von Filtrationsdruck und kolloidosmotischem Druck wird eiweißarme Flüssigkeit im arteriellen Schenkel der Kapillaren filtriert. Im venösen Kapillarschenkel wird Gewebewasser resorbiert. Der mittlere Kapillardruck und folglich der kapilläre Flüssigkeitsaustausch ist bei normaler Durchblutung vom Verhältnis des post- und präkapillären Widerstandes zueinander, vom arteriellen Druck und vom venösen Ausflußdruck abhängig (Remien, Habilitationsschrift 1974).

Ein geringer Teil des Filtrates wird nicht resorbiert, sondern auf dem Lymphweg aus dem Gewebe transportiert. Nach Casley-Smith, Piller (1973) und Felix (1980) verlassen vorwiegend großmolekulare Plasmaproteine, die normalerweise nicht durch Diffusion wieder in die Blutbahn eintreten können, das Gewebe als Lymphe. Ein Ödem entsteht, wenn mehr Flüssigkeit ins Gewebe einströmt als aus ihm abfließt (Felix 1974, 1976). Filtration und Resorption spielen dabei die entscheidende Rolle, jedoch treten auch bei Behinderung des Lymphabflusses allmählich erhebliche Ödeme auf (Földi 1973, Klüken 1980, Hauck 1980).

Zu diesen drei Größen des Volumentransportes zwischen Intravasal- und Extravasalraum treten noch weitere Mechanismen, die in den Regelkreis des transkapillären Flüssigkeitsaustausches eingreifen (nach Trautwein 1972):

- Steuerung der Mikrozirkulation
- interstitieller Raum
- Permeabilität der Endothelzellen

Steuerung der Mikrozirkulation. Die Mikrozirkulation beeinflusst sowohl die Blutperfusion einzelner Organe als auch die gesamte Kreislauftsituation eines Organismus. Änderungen im Durchmesser der Arteriolen bestimmen den peripheren Widerstand des Gesamtkreislaufes und somit den Blutdruck und die Nachlast des Herzens. Durch Variation des Kontraktionszustandes der Venulen, vor allem im Splanchnikusgebiet, kann die Volumenkapazität des kardiovaskulären Systems aktiv kontrolliert werden. Dies wirkt sich direkt auf die Füllung des rechten Herzens und auf das Schlagvolumen aus.

In der Haut dienen Kontraktion und Dilatation der Arteriolen und Venulen überwiegend der Thermoregulation (Trautwein et al. 1972). Bei Kälte wird die Bindung von Noradrenalin an alpha-Rezeptoren stärker. Dies führe zur vasokonstriktiven Reaktion der Hautgefäße auf Kälte (Vanhoutte 1982). Neben einigen endogenen vasoaktiven Substanzen wie Adrenalin, Angiotensin II und Thromboxan A_2 hat vor allem das sympathische Nervensystem eine dominierende Rolle in der Steuerung der Mikrozirkulation inne (Trautwein et al. 1972, Vanhoutte 1982). Dabei soll die Noradrenalin-Freisetzung aus den varikösen Auftreibungen sympathischer Nerven über alpha-Rezeptoren an glatten Muskelzellen eine Tonuserhöhung bewirken. Dies führt zu einer Engerstellung von Arteriolen und Venulen.

Die Noradrenalin-Freisetzung wird in der Peripherie durch vasoaktive

Substanzen wie Acetylcholin, Adrenalin und Histamin moduliert. Dabei erscheint es wahrscheinlich, daß Acetylcholin cholinergner Nerven an Muskarin-Rezeptoren der sympathischen Nerven eine Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung bewirkt (Vanhoutte, Shepherd 1983). Eine direkte hemmende Wirkung auf den Kontraktionszustand glatter Gefäßmuskulatur durch endogenes Acetylcholin sei eher unwahrscheinlich.

Über Beta-Rezeptoren, ebenfalls in den präsynaptischen Vesikeln sympathischer Nerven, soll durch Adrenalin die Freisetzung von Noradrenalin gesteigert werden. Nach diesem Modell setzen sowohl Acetylcholin als auch Adrenalin an den präsynaptischen Endigungen sympathischer Nerven an und beeinflussen über eine Modulation der Noradrenalinfreisetzung den Kontraktilitätszustand von Arteriolen und Venulen.

Im Gebiet der Mikrozirkulation wird über Veränderung der lokalen Filtrationsdrucke die Möglichkeit geschaffen, zwischen extremer Nettofiltration und extremer Nettoabsorption zu variieren. Histamin z. B. blockiert einmal die Freisetzung von Noradrenalin und führt so zu einer Dilatation der Arteriolen. Auf der anderen Seite setzt es den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur in Venulen herauf und führt zu deren Engerstellung (Vanhoutte 1982). Die so veränderte Hämodynamik hat in Begleitung der ebenfalls durch Histamin erhöhten Endothelpermeabilität eine massive Exsudation von Flüssigkeit ins Interstitium zur Folge.

Interstitieller Raum. Unter normalen Bedingungen besitzt der interstitielle Raum ein festes Bindegewebsgefüge und ist wenig dehnbar. Er kann somit nur eine beschränkte Flüssigkeitsmenge aufnehmen. Die Flüssigkeit ist in Form ultramikroskopischer Tröpfchen (Sol) in ein Gel eingelagert, das das Interstitium ausfüllt. Nach Brace (1978) basiert der interstitielle Druck des subcutanen Bindegewebes zu einem Drittel bis zur Hälfte auf dem osmotischen Druck der Hyaluronsäuremoleküle. Diese sind ebenfalls in dieses Gel verpackt und beeinflussen durch den Grad ihrer fermentativen Zerlegung in Bruckstücke den osmotischen Druck im Interstitium entscheidend. Dadurch und durch viele noch ungeklärte Möglichkeiten kann sich das Filtrationsgleichgewicht zugunsten einer Wassereinlagerung ins Interstitium verschieben. Mit zunehmender Flüssigkeitsaufnahme setzt das Interstitium einer weiteren Dehnung nur geringen Widerstand entgegen (Trautwein et al. 1972). Damit sind von dieser Seite pathologische Bedingungen

für eine lokale Ödementstehung geschaffen.

Unter diesen Gesichtspunkten sollten sich Fragen über ödemproduzierende Prozesse bzw. Pharmaka wie über ödemprotektive Pharmaka auch mit ihrer Wirkung auf den interstitiellen Raum befassen.

Permeabilität von Endothelzellen. Ungeachtet der zahlreichen Methoden, Ödeme künstlich zu erzeugen, kann die Erhöhung der Permeabilität von Kapillaren und Venulen auf ähnliche, morphologisch faßbare Veränderungen der Endothelien bezogen werden (Hammersen 1968, 1972 a, b, 1982, Hammersen, Hammersen 1983 b):

- 1) An den Endothelien läßt sich nach Hammersen ultrastrukturell ein vermehrtes Auftreten größerer Vesikel und Vakuolen nachweisen.
- 2) Die Endothelien sind abgeflacht und weisen an ihrer Oberfläche zahlreiche "knopf- oder warzenförmige Protuberanzen" auf (Hammersen).
- 3) Der interendotheliale Spalt ist von der Oberflächenveränderung der Endothelien mit betroffen. "Es entstehen unterschiedlich große, lokal begrenzte Lücken" (Hammersen 1968, Casley-Smith et al. 1973).
- 4) Durch Vesikelfusion entstehen transendotheliale Kanäle.

Hammersen (1971) führt diese Veränderungen auf eine generelle Membranstimulierung der ödemerzeugenden Wirkstoffe zurück.

Majno et al. (1969, aus Casley-Smith et al. 1973) zeigten, daß Entzündungsmediatoren an Venulen eine Kontraktion der Endothelzellen bewirken. Elektronenmikroskopisch wird versucht (Casley-Smith, Bolton 1973), diese Kontraktion in Verbindung mit den weit geöffneten interendothelialen Spalten und der ansteigenden Permeabilität dieser Endothelien zu bringen.

Da sich Struktur (Trautwein 1972) und Permeabilität (Simionescu et al. 1978) im Verlauf des Mikrozirkulationsgebietes ändern, ist von morphologischen Untersuchungen eine genaue topographische Beziehung der beschriebenen Strukturen zu fordern. Während ursprünglich die Kapillarwand als die einzige Austauschfläche angesehen wurde, hat sich im Lauf der Zeit herausgestellt, daß auch im Bereich der Venulen erhebliche Austauschvorgänge stattfinden. Besonders im Gefäßbett des Muskels finden sich die Gebiete des praktisch ungehinderten Plasmadurchtritts ins Interstitium in den venösen Kapillaren und Venulen (Landis, Pappenheimer 1963).

Allgemein werden die Kapillaren venenwärts weiter, d. h. ihre Oberfläche nimmt zu. Gleichzeitig wird auch die Permeabilität pro Flächen-

einheit größer (Trautwein 1972). Daraus mag sich auch erklären lassen, warum bei einigen Ödemmodellen die Endothelschädigungen an der venösen Seite des Kapillargebietes früher und ausgeprägter auftreten (Hammersen 1971, 1972 a, 1972 b, Casley-Smith et al. 1973).

Übersicht über Mechanismen der antiödematösen Wirkung bei Flavonoiden, Steroidsaponinen und deren Derivaten

Wirkung auf Endothelzellen. Das Endothel der Gefäßwände sitzt an der Grenzstelle zwischen dem Medium des Stofftransportes und dem des Stoffumsatzes. Diese bekannte Funktion beinhaltet eine Durchschleusung der gesamten Stoffwechselprodukte durch das Endothel in zwei Richtungen. Zu einem gewissen Teil besitzt dieses dabei eine selektive Permeabilität mit aktivem Transport. Es erscheint deshalb plausibel, daß es schwerwiegende Folgen hat, wenn das Endothel funktionell oder morphologisch gestört ist. Neben seiner Eigenschaft als selektiv permeable Membran für den Stoffaustausch zwischen Blutzellen, Plasma und Interstitium ist das Endothel wegen seiner anti-thrombotischen Oberfläche (Cazenave et al. 1983) und wegen seiner Rolle bei der Regulierung der Hämostase für die Blutzirkulation von Bedeutung. In neuerer Zeit sind weitere Funktionen der Endothelzellen untersucht worden. So sollen sie aktiv an der Umwandlung bzw. am Abbau verschiedener Plasmabestandteile wie Angiotensin, Bradykinin und Noradrenalin beteiligt sein (Vanhoutte, De Mey 1983). Weiter wird eine Beeinflussung des Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen durch Endothelzellen nachgewiesen: Reaktionen der Gefäße auf z. B. ACh, auf ADP und ATP, auf Bradykinin und Arachidonsäure werden durch Endothelzellen vermittelt (Vanhoutte, De Mey 1983). Dies spreche für eine myoendotheliale Kopplung bestimmter Gefäßreaktionen.

Dieses hochstrukturierte Steuerungssystem der Endothelzelle soll durch antiödematös wirkende Substanzen morphologisch und/oder in seiner Funktion erhalten werden.

Protektiver Effekt auf Membranen allgemein

(Hammersen 1968, 1972 a, 1972 b, 1978) In Versuchen, bei denen Dextran- oder Phospholipaseödeme erzeugt wurden, wirkten Flavonoide (Hydroxyethylrutoside) membranprotektiv. Es wurden sowohl Endothel- als auch Erythrozytenmembranen untersucht. Dabei konnten die Schädigungen durch

Dextrane oder Phospholipase signifikant gemindert werden, wenn Flavonoide vorher den Versuchstieren zugeführt worden waren. Eine Schutzwirkung ödemprotektiver Pharmaka auf den Glukosaminoglykanstoffwechsel wird diskutiert (Hammersen 1982). Nach Casley-Smith (1976) beruht ein Teil der Flavonoidwirkung auch auf einer Stärkung der interendothelialen Bindungen an den interendothelialen Spalten. Eine membranstabilisierende Wirkung gewisser Saponine und Sapogenine konnten Abe et al. (1981) nachweisen. In ihren Versuchen schützten Saikosaponine Erythrozyten wirksam gegen hypotonische und hitzeinduzierte Hämolyse. Vogel, Ströcker (1966) kommen bei Versuchen über die Plasma-Lymph-Schranke und über die Permeabilität von Kapillarmembranen zu dem Schluß, daß die in der Literatur den Flavonoiden zugesprochene Wirkung, Kapillarmembranen "abdichten" (Seidenberger et al. 1974), experimentell nicht bestätigt werden könne. Die verwendeten Pharmaka waren u. a. Hesperidin, TMIC und Aescin. Allerdings wurden diese Untersuchungen an intakten Kapillaren angestellt und nicht bei pathologisch gesteigerter Kapillarpermeabilität. Dies scheint für die Frage nach der Wirkung von Flavonoiden und Saponinen auf die Kapillarpermeabilität von großer Bedeutung zu sein. Es liegt der Schluß nahe, daß Flavonoide und Saponine des Ruscus-Extraktes einen protektiven Effekt auf eine gesteigerte Kapillarpermeabilität haben. Dies bedeutet, daß sie den Einfluß endothelschädigender Agenzien mindern oder aufheben. Vermutlich kommt es dadurch nicht zu der erwarteten erhöhten Kapillarpermeabilität bei primär entzündlichen, allergischen oder direkt toxischen Prozessen.

Aussagen über den genauen morphologisch-physiologischen Bezug der Membranwirkung von Flavonoiden und Steroidglykosiden sind unsicher und durch regelmäßig neu interpretierte Modelle der Mikrogefäßwände und deren Physiologie erschwert (Lit. bei Hammersen 1982).

Permeabilitätsabnahme. Permeabilitätssteigerungen durch Histamin, Serotonin und Bradykinin lassen sich durch Flavonoide hemmen (Gábor, Blaszó 1978, von Cauwenberge, Franchimont 1967, 1968). Über eine Permeabilitätsabnahme und daraus resultierenden antiödematösen Effekt von O-(beta-Hydroxyethyl)rutosiden mit vermindertem Flüssigkeitsgehalt des Interstitiums berichten Felix (1972) und Roztocil et al. (1977).

Svensjö (1977) konnte eine Hemmung des Prostaglandins E_2 durch IIR erreichen und dadurch die entzündungsbedingte Permeabilitätssteigerung drosseln.

Kapillarabdichtende Wirkung. Seidenberger (1974) subsumiert unter

diesen Begriff die erhöhte Kapillarresistenz, etwa nach TMIC-Applikation bei Skorbut (Gábor et al. 1968, 1970) und bei hitzegeschädigten Hautgefäßen (Bohr et al. 1949).

Wirkung auf Basalmembran. Eine Verdickung der Basalmembran beim peritonealen Fremdkörpergranulom nach HR-Verabreichung konnten Leu et al. (1968) beobachten. Ob eine BM-Verdickung einen Einfluß auf die Kapillarpermeabilität hat, ist nicht entschieden. Hammersen achtet die Barrierefunktion der BM als sehr gering (1973).

Wirkung auf Mikrozirkulation

- Gefäßtonisierung. Bei der Besprechung über Wirkung und Wirkungsmechanismen von Flavonoiden und Steroidglykosiden wie Saponinen des Ruscus-Extraktes ist wenig so umstritten wie Angaben über einen gefäßtonisierenden Effekt. Vor dem Hintergrund, daß die Flavonoide und deren Derivate sowie Steroidglykoside eine sehr heterogene Gruppe sind, können pauschale Beschreibungen von deren Eigenschaften nur tendenziellen Charakter haben. Von einer direkten vasokonstriktorischen Wirkung sprechen Tarayre et al. (1977) bei Untersuchungen mit TMIC und Merlen-Coget (1975) mit Flavonoiden allgemein, ebenfalls Schiller (1951). Die Ansicht, daß Flavonoide in ihrer Wirkung komplex sind und möglicherweise die Mikrozirkulation in mehreren Punkten entscheidend beeinflussen, wurde bereits 1958 geäußert (De Fels, Lit.: Vogel 1966). Tarayre et al. (1976, 1977) zeigten, daß TMIC die durch Nicotinsäure hervorgerufene Hyperämie reduzieren kann und vermuten entweder einen direkten Angriff von TMIC auf die "präkapillären Sphincter" oder eine Verstärkung der Katecholaminwirkung durch Hemmung der Catechol-O-Methyl-Transferase. Roztocil et al. (1977) begründen ihre durch Hydroxyethylrutoside am Menschen nachgewiesene Abnahme der Kapillarpermeabilität mit einer Verkleinerung der Kapillaroberfläche. Diese werde ebenfalls durch die Wirkung der Substanz oder deren Metaboliten auf die "präkapillären Sphincter" hervorgerufen. Eine Änderung des Blutflusses oder der Venenkapazität konnte in diesen Versuchen nicht beobachtet werden. Zu gegenteiligen Ergebnissen, nämlich zu Vasodilatation unter dem Einfluß von Rutin kommen Kuschinsky et al. (1949).

Der in diesem Zusammenhang häufig angeführte Bezug, "kontraktile Elemente im Gebiet der Mikrozirkulation ist gleich präkapilläre Sphincter", muß wohl korrigiert werden.

Die physiologisch geforderten präkapillären Sphincter mit einer von den Arteriolen unabhängigen Funktion können morphologisch beim Men-

sehen nicht nachgewiesen werden (Hammersen 1973). Vielmehr treten Arteriolen durch ihre kontraktile Gefäßwand funktionell an die Stelle der "präkapillären Sphinkter". Auch die Endstrecken des Mikrostromgebietes der Kapillaren, die Venulen, besitzen kontraktile Gefäßwände und bestimmen zusammen mit den Arteriolen die Perfusions- und Austauschvorgänge im Endstromgebiet (Vanhoutte, P. M. 1982, 1983).

- Blutstrombeschleunigung. Flavonoide beschleunigen den Blutstrom (Merlen, Coget, 1975). Zu diesem Ergebnis kam auch Klemm (1979) bei der Anwendung von Daflon^R, in dem Diosmin, Hesperidin und wasserlösliche Flavonoide enthalten sind. Nach der kombinierten Gabe von TMIC, Ruscus und Ascorbinsäure, wie sie in dem Venentherapeutikum Phlebodril^R enthalten sind, konnte eine Verbesserung der Ruhedurchblutung um 15% und eine Steigerung des venösen Rückstromes um 17% beobachtet werden (Klemm 1981). Mit Venostaslin^R, einem Roßkastanienextrakt, erhöhte sich die venöse Strömungsgeschwindigkeit an Patienten mit Varikosis um 29,6% (Klemm 1982). Dies wird auf einen venotonisierenden Effekt des Wirkstoffes zurückgeführt. Ebenfalls für Roßkastanienextrakt haben Pauschinger et al. (1974) eine Steigerung der peripheren Durchblutung nach oraler Anwendung bei Versuchspersonen festgestellt. Für TMIC, einer Komponente des Phlebodril^R, postuliert Coget (1983) eine verstärkte Blutzirkulation auf der Ebene der Endstrombahn mit gesteigerter Flußrate in Arterien und Kapillaren. Roztocil et al. (1977) hingegen können in Untersuchungen über den Einfluß von Hydroxyethylrutosiden am Menschen keine Änderung des Blutstroms registrieren. Erklärung für die zum Teil konträren Ergebnisse könnten die sehr unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der Vasokonstriktion und die verschiedenen verwendeten Pharmaka sein. Eine andere Möglichkeit, diese Unterschiede zu erklären, ist die Annahme, daß Flavonoide eine Konstriktion von Arteriolen und eine Dilatation arteriovenöser Anastomosen, verbunden mit Dilatation auch größerer Gefäße, bewerkstelligen (Casley-Smith, 1976).

Wirkung auf interstitielle Bereiche. Das Interstitium ist neben der Gefäßwand, ihrer Struktur und Permeabilität und neben den lokalen Steuerungen der Mikrozirkulation ein weiterer wichtiger Regler für den transkapillären Flüssigkeitsaustausch. So ist nach Casley-Smith (1976) die Durchschleusung von Flüssigkeit oder gar von größeren Molekülen durch die Kapillarwand nicht nur eine Funktion des Endothels, sondern ebenso eine der Permeabilität des umgebenden Gewebes.

Für pharmakologische Fragestellungen liegt folglich die Schwierigkeit auch in der Differenzierung, ob ein Pharmakon die Permeabilität der Gefäßwandung für Moleküle bestimmter Größe, den intrakapillären hydrostatischen Druck, das Strukturgefüge des Interstitiums jeweils isoliert oder in Kombination miteinander beeinflusst.

Merlen, Coget (1975) beschreiben die Wirkung von Bioflavonoiden allgemein mit "Beeinflussung der Bindegewebsspannung", wobei ein verdichtetes Grundgerüst und eine Schutzwirkung auf den Polymerisationszustand der Mukopolysaccharide eine Rolle spielen soll. Die Permeabilität des interstitiellen Gewebes als Einheit haben Tesi, Forssmann (1971) unter dem Einfluß eines Flavonoids, eines (+)-Catechin-derivates, am Mesenterium der Ratte untersucht. Es wurde eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der Permeabilität für Inulin C^{14} gefunden. Für Rutin haben Fabianek und Ilcrp (1965), Lit. bei Casley-Smith (1976) eine Permeabilitätsabnahme am Bindegewebe der Haut für Evans-blue und Kochsalz um 10% gemessen.

Bei Untersuchungen über den Stoffwechsel der Venenwand (Laszt 1971, 1972, 1976, Niebes 1972) konnte eine Änderung in der Ultrastruktur von Kollagen und Elastin in varikösen Venen festgestellt werden, die auf eine Vermehrung der katabolen Enzyme des Mukopolysaccharidstoffwechsels zurückgeführt wurde. So lag z. B. eine Aktivitätserhöhung von Hyaluronidase in varikösen Venen von 10% - 35% vor (Niebes, Laszt 1971, Niebes 1972). Durch Flavonoide, Hydroxyethylrutoside und (+)-Catechine ließ sich eine Hemmung der Hyaluronidase und anderer Enzyme des Mukopolysaccharidabbaues erzielen (Niebes, Laszt 1971, Estler 1971, Gábor 1972, Tarayre 1976, Joyce 1979).

Ionati-Galligani et al. (1979) wiesen an menschlichen Fibroblastenkulturen eine hemmende Wirkung von (+)-Catechin (Flavonoid) auf die Kollagensynthese nach. Es wird über eine signifikante Reduzierung der Prolylhydroxylase (durch kompetitive Hemmung) um 50% berichtet.

Wirkung auf Makrophagen, Proteolysesteigerung

Es existieren zahlreiche Denk- und Versuchsmodelle, um Licht in den oder die Wirkungsmechanismen der Flavonoide und Steroidsaponine zu bringen. Während Hammersen die Beeinflussung des Dextranödems (1968, 1972 a, 1978), des Phospholipaseödems (1972 b) und des Tourniquet-Syndroms (1978) an der Ratte durch Hydroxyethylrutoside auf eine nachweisbare Reduzierung der pathologischen Interendothellücken zurück-

führt, verlagern andere Autoren den Wirkort der Flavonoide ins Interstitium.

Ihnen zufolge setzen Flavonoide und verwandte Substanzen die Permeabilität der Kapillarwand für Proteine nicht herab, sondern erhöhen sie eher (Casley-Smith, Piller 1973, Casley-Smith et al. 1974, 1975, Casley-Smith 1976, 1979, Leconte et al. 1971, 1974, Földi, Casley-Smith 1978).

Des weiteren würden auch die Endothelrücken bei erzeugtem Ödem zahlen- und größenmäßig nicht reduziert, wie Hammersen nachwies, sondern es wäre je nach Dosierung und Flavonoidderivat gar eine Zunahme der Läsionen zu beobachten. Dies bedeutet, eine zusätzlich endothelschädigende Wirkung einiger Flavonoide kann nicht ausgeschlossen werden, z. B. bei Hydroxyethylrutosiden und Coumarin (Casley-Smith et al. 1973, 1974, Piller 1977).

Nach Meinung einiger Autoren wird diese an sich ödemfördernde Eigenschaft von Flavonoiden wettgemacht durch eine erhöhte Proteolyse, die an Makrophagen des Interstitiums induziert wird (Földi et al. 1973, Kriz 1975, Piller 1977, Casley-Smith 1976, 1979). Durch die vermutlich intrazellulär in den Makrophagen stattfindende Proteolyse werden die Makroproteine des Ödems in kleinere Peptide und Aminosäuren zerlegt. Für diese Bruchstücke bestehe einmal ein Konzentrationsgradient vom Interstitium zum Intravasat und zum anderen sei es ihnen bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von weniger als 10 000 (Lospalluto et al. 1971, aus Földi, Casley-Smith 1978) möglich, nahezu ungehindert durch das Endothel zurück zu diffundieren.

Für diese These über den Wirkmechanismus von Flavonoiden und Saponinen sprechen folgende Ergebnisse:

- Ödemreduzierung ist auch möglich, wenn die physiologischen Transportwege von Makroproteinen aus dem Interstitium, die Lymphgefäße, im Versuch unterbunden sind (Casley-Smith 1976, Földi et al. 1973).
- an Makrophagen läßt sich durch Coumarin und Troxerutin (= Trihydroxyethylrutoside) in vitro eine 2 1/2fache Steigerung der Proteolyse erreichen (Lit. bei Földi, Casley-Smith 1978):
- werden die Makrophagen durch Quarz "vergiftet", tritt in vivo keine ödemreduzierende Wirkung obiger Substanzen auf (Földi, Casley-Smith 1978).
- Flavonoide sind an Proteine gebunden (Piller 1977, Bauer-Staeb, Niebes 1976, Gugler et al. 1975) und würden somit bei Ödementstehung ins Interstitium gelangen. Dies wäre auch eine Erklärung für die

Beobachtung, daß Flavonoide, z. B. TMIC, an intakten Kapillarmembranen die Permeabilität nicht reduzieren (Vogel, Ströcker 1966) und daß eiweißarme, rein hämodynamisch durch vermehrte Filtration akut entstehende Ödeme nicht durch Flavonoide günstig beeinflußt werden (Felix 1980 a/b).

- wenn die Wirkung von Flavonoiden allein auf die Kapillar- und Venulendothelien beschränkt wäre, wären Ödemformen nicht beeinflussbar, die ohne primäre Alteration der Endothelien zustande kommen und eiweißhaltig sind, wie z. B. lymphostatische Ödeme (durch Ligation von Lymphgefäßen). Casley-Smith et al. (1974) weisen aber einen ödemreduzierenden Effekt von Coumarin am cervicalen Lymphödem der Ratte nach.
- zur Therapie bereits bestehender Ödeme wäre ein Wirkmechanismus, der die interstitiell eingelagerten Proteine mit ihrer ödeminduzierenden osmotischen Sogwirkung "beseitigt", vorteilhafter und ließe sich mit dem Gedanken einer curativen Wirkung verbinden.

Gegen diese Hypothese sprechen Befunde, wonach Flavonoide und Steroidglykoside (z. B. Saponine aus Ruscusarten) auch an anderen Membranen protektiv im weitesten Sinne wirken.

- Einen wirksamen Schutz durch O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside, TMIC und Ruscus gegen die schädigende Wirkung der Etacrynsäure konnten Felix et al. (1983 a, b) und Felix et al. (1984) sowohl am Hinterlauf der narkotisierten Katze, an isolierten Pfortadern und Aorten der Ratte als auch an Ileumstreifen des Meerschweinchens aufzeigen. Es sollte damit die unspezifische Wirkung der Flavonoidderivate und des Ruscus-Extraktes gegenüber sehr unterschiedlichen Gewebestrukturen deutlich gemacht werden.
- Aus Untersuchungen (Yanase et al. 1983) über den biochemischen Mechanismus, auf dem der Einfluß der Etacrynsäure basieren könnte, läßt sich ein Eingriff in den Energiestoffwechsel von Mitochondrien ableiten. Deshalb erscheint es möglich, daß Flavonoide wie Steroidglykoside bereits an diesem Punkt wirksam werden, indem sie z. B. das Eindringen der Etacrynsäure ins Zellinnere oder in die Mitochondrien verhindern oder selbst am Energiestoffwechsel der Mitochondrien ansetzen.
- So wiesen Hammersen, Möhring (1972) und Hammersen (1972) an Erythrozyten nach, daß O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside schwere Zellveränderungen, hervorgerufen durch Phospholipase A, quantitativ reduzieren,

zum Teil vollständig verhindern können.

- Rutoside vermögen Erythrozyten auch gegen verschiedene Hämolytine zu schützen (Biesendorfer et al. 1980).
- Aescin und Rutoside vermindern die schädigende Wirkung der Etacrynsäure und von Polidocanol auf die Kontraktilität isolierter Gefäßstreifen der Rattenpfortader (Felix 1978). Daraus wurde eine von der schädigenden Substanz unabhängige, unspezifische Schutzwirkung der Hydroxyethylrutoside abgeleitet.
- Einen membranstabilisierenden Effekt von Saponinen an Erythrozyten gegen hypotonische und hitzeinduzierte Hämolyse konnten Abe et al. (1981) aufzeigen.

Es ist nicht auszuschließen, daß diese unterschiedlichen Resultate zum Teil auf unterschiedlichen Wirkmechanismen verschiedener Flavonoid-derivate und Steroidglykoside beruhen. Desgleichen darf die unterschiedliche Dosierung gleicher Pharmaka nicht darüber hinwegtäuschen, daß gerade hier entscheidende Änderungen im Gesamtwirkungsbild zutage treten können.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Zusammenschau dieser zum Teil konträren Ergebnisse und Deutungen experimenteller Befunde liegt darin, daß sich die äußeren Versuchsbedingungen bei den verschiedenen Autoren kaum je gleichsetzen lassen. Geprüft werden verschiedene Derivate von Flavonoiden und Steroidglykosiden an verschiedenen Tierspezies oder unterschiedlichen Organ- und Gefäßgebieten in unterschiedlicher Dosierung. Ähnliche Erschwernisse bringt der Vergleich von in vitro- mit in vivo-Versuchen. Deshalb sind Reihenversuche mit überschaubarer Variation der Versuchsanordnung zur vergleichenden Beurteilung medizinisch-pharmakologischer Fragestellungen besonders vorteilhaft.

Wirkung auf Enzyme und Entzündungsmediatoren

Bei der Beschreibung der Wirkungen und Wirkmechanismen von Flavonoiden und Steroidglykosiden tritt eine unüberschauliche Fülle von Untersuchungen über Einflüsse auf Stoffwechsellenzyme ans Licht (Böhm 1967, Seidenberger et al. 1974, Gábor, Blaszo 1978, Gábor 1979). Im Rahmen dieser Arbeit wird nur auf die Wechselwirkungen mit Enzymen eingegangen, die für den Problembereich Ödengenese und -therapie von Bedeutung zu sein scheinen.

Auf die hyaluronidasehemmende Wirkung einiger Flavonoide u. a. des TMIC wurde bereits verwiesen.

Die Hemmung der in den Katecholaminabbau zwischengeschalteten Enzyme Katecholamin-O-methyl-transferase (COMT) und Monaminoxidase (MAO) durch Flavonoide (Spector, Willoughby 1960, Estler 1971, Gábor 1972, Schwabe, Flohe 1972, Gugler, Dengler 1973, Tarayre, Lauressergues 1977) soll eine periphere vasokonstriktorische (Crismon 1951, Schiller 1951) und eine entzündungshemmende Wirkung (Kátó, Gözsy 1969 aus Gábor 1979) einiger Flavonoide erklären.

Des weiteren wird die entzündungshemmende Wirkung von Flavonoiden auf eine Hemmung von Histamin, Bradykinin und Serotonin zurückgeführt (Lit. bei Gábor 1979).

Fewtrell, Gomperts (1977), Bennet et al. (1981) und Middleton, Drzewiecki (1982) beschreiben einen hemmenden Effekt einiger Flavonoide auf die Sekretion von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten.

Bei Mastzellen sollen Flavonoide an der Ca^{++} -abhängigen ATPase in der Plasmamembran ansetzen und durch eine Hemmung der aktiven Ca^{++} -Aufnahme die Freisetzung von Entzündungsmediatoren verhindern. Die anti-phlogistische Wirkung von TMIC, basierend auf diesen Mechanismen, wurde von Tarayre, Lauressergues (1975, 1976) nachgewiesen. Saponine (z. B. Aescin) sollen bevorzugt auf die initiale Phase eines Entzündungsprozesses wirken (Vogel, Uebel 1960, Rothkopf, Vogel 1976), so daß von einer antiexsudativen Wirkungsweise gesprochen wird.

- Prostaglandine. Die in neuerer Zeit vermehrt mit wissenschaftlicher Aufmerksamkeit bedachten Prostaglandine spielen bei Permeabilitätserhöhungen infolge entzündlicher Prozesse eine wichtige Rolle (Williams, Moreley 1973). So sollen PGE_1 , PGE_2 , PGF_{1a} die Wirkung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin und Bradykinin verstärken. Baumann et al. (1979) zeigten in Studien an der Prostaglandin-Synthese, daß Bioflavonoide je nach Struktur mehr oder weniger ausgeprägte Hemmstoffe der Prostaglandin-Synthetase sind. Daraus läßt sich folgern, daß der entzündungshemmende Effekt und auch die antiödematöse Wirkung vieler Flavonoide beim Histaminödem über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese ablaufen könnte. Svensjö et al. (1977) beobachteten bei Permeabilitätsuntersuchungen an der Wangentasche des Hamsters eine Verminderung der Prostaglandin E_2 Aktivität durch O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside.

2. M E T H O D I K

Die Kitten wurden am Hinterlauf von 93 männlichen und weiblichen Katzen mit einem mittleren Gewicht von $2,62 (\pm 0,27)$ kg erzeugt. Die Tiere wurden mit 60 mg Chloralose/kg Körpergewicht narkotisiert. Die Chloralose wurde in warmem Wasser gelöst und über eine Magensonde verabreicht. Nach etwa zwei Stunden war die Narkose ausreichend tief und hielt während des gesamten Versuches an.

Bei Bedarf wurde zur sicheren Anästhesie 0,5 - 1 ml/kg Ketanest^R i. m. injiziert.

Zur Heparinisierung wurden 2000 USP Einheiten/kg Heparin (Liquemin^R) in NaCl in die Schläuche des extrakorporalen Kreislaufes gegeben und nach Beginn der Beinperfusion sowie während des Versuches i. v. appliziert.

Nach Beendigung der Präparation und während des Versuchsverlaufes wurden pH, $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ bestimmt. Von der Norm abweichende Werte wurden durch künstliche Beatmung bzw. durch Natriumbicarbonat korrigiert.

Präparation. Bei allen Tieren wurde die Trachea unterhalb des Kehlkopfes freigelegt und eine Glaskanüle (im Durchmesser der Trachea) eingelegt. Über diese konnte die Atmung fortlaufend über Thermistoren (Felix 1962) registriert und bei Bedarf ein Beatmungsgerät angeschlossen werden.

Um für die isolierte Perfusion eines Hinterlaufes der Katze arterielle und venöse Zugänge zu erhalten, wurden in Höhe des Ligamentum inguinale die Vasa femoralia freipräpariert. Alle Seitenäste der Arteria und Vena iliaca bzw. der Arteria und Vena femoralis in Höhe des Ligamentum inguinale wurden ligiert. In diesen Gefäßabschnitt mündeten dann die Abgänge des extrakorporalen Kollateralkreislaufes.

Nach Freilegen der Nn. femoralis et ischiadicus wurde unter Schonung dieser Nerven- und Gefäßstränge die Oberschenkelmuskulatur möglichst proximal zu beiden Seiten der Gefäße mit 5 mm breiten PVC-Bändern unterbunden. Dies diente zur Unterbrechung des Lymphabflusses aus dem Bein.

Die Tiere lagen mit dem Rücken auf einer beheizten Tischplatte, die thermostatisch geregelt eine Temperatur von 37° C besaß. Gegen Abkühlung nach oben wurden die Tiere mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Die Lufttemperatur am Tier betrug annähernd konstant 32° C. Um den Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung so gering wie möglich zu halten, wurden die Wunden nach Abschluß der Präparation mit Kochsalzfeuchten Kompressen belegt.

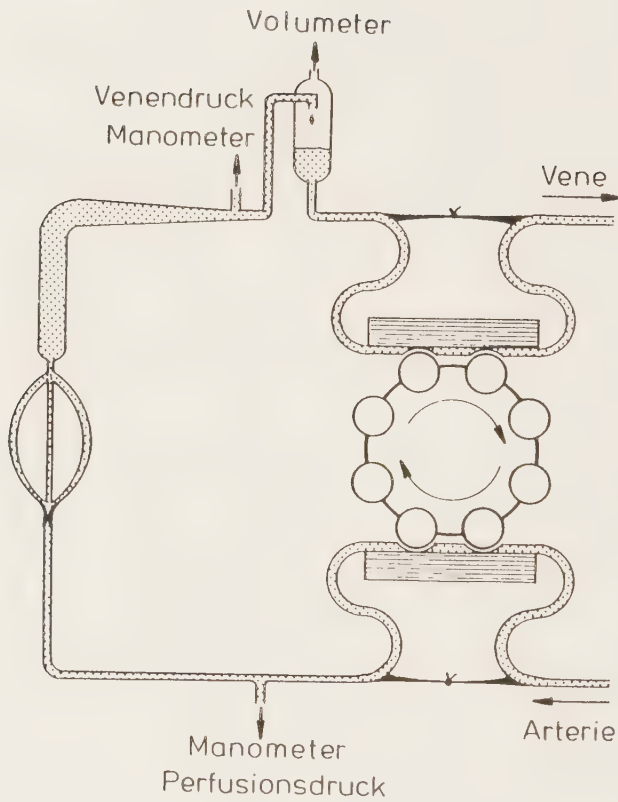


Abb.: 1 Perfusionstechnik (nach Felix et al. 1983/b)

Arteriell und venöses Blut einer Extremität werden mit gleicher Stärke perfundiert. Änderungen des transkapillären Flüssigkeitsaustausches und des Venenvolumens zeigen sich als Volumenänderungen in der Überlaufkammer. Änderungen des präkapillären Widerstandes werden in der Größe des arteriellen Perfusionsdruckes registriert.

Im Folgenden wird eine Perfusionstechnik beschrieben, mit der sowohl der Tonus der verschiedenen prä- und postkapillären Gefäße als auch der transkapilläre Flüssigkeitsaustausch gemessen werden kann. Zum Nachweis des ins Gewebe filtrierte Ödemeiweißes wurde zusätzlich eine Farbstoffmethode angewandt.

Perfusionstechnik. Das Prinzip der Technik war die strömungskonstante Perfusion. In einer Röhre hängt der Druck von der Stromstärke, der Viskosität der Flüssigkeit und dem Widerstand, der durch die Abmessungen der Röhre bedingt ist, ab. Wenn Stromstärke und Viskosität konstant sind, nimmt der Druck in einer zylindrischen Röhre vom Anfang bis zum Ende linear ab. Denn an jeder Stelle der Röhre ist der Druck immer nur von dem Widerstand des stromabwärts gelegenen Teils abhängig. Wird die Röhre in der Mitte verengt und damit der Widerstand in diesem Bereich erhöht, dann steigt der Druck parallel, aber nur oberhalb des verengten Abschnitts. Die Konstriktion hat also keinen Einfluß auf den Druck im stromabwärts gelegenen Teil der Röhre. Für den Kreislauf bedeutet dies, daß eine Änderung des Arteriolentonus unter strömungskonstanten Bedingungen den Druck in den Kapillaren und postkapillären Gefäßen nicht beeinflusste. Sie erhöhte oder senkte nur den Druck in den präkapillären Gefäßen. Damit war der arterielle Perfusionsdruck dem Arteriolentonus direkt proportional.

Die Perfusionsstärke wurde so eingestellt, daß der arterielle Perfusionsdruck ebenso groß war wie der systemische Blutdruck. Die Perfusionsstärke war dann gleich der physiologischen Durchblutung. Sie wurde während des gesamten Versuches konstant gehalten. Vor den venösen Teil der Pumpe war eine Überlaufkammer eingeschaltet (Abb. 1, S. 22). Eine Volumenänderung in dieser Überlaufkammer resultierte aus einer Änderung der intravasalen Flüssigkeitsvolumina (Felix et al. 1971), hervorgerufen entweder durch Verkleinerung oder Vergrößerung des Gefäßvolumens oder durch Verschiebungen im Flüssigkeitsaustausch zwischen Gewebe und Endstrombahn. Das Volumen in der Überlaufkammer nahm zu, wenn mehr venöses Blut aus dem Beingewebe abströmte als die venöse Pumpe nach zentral weiterbeförderte. Umgekehrt nahm das Volumen in der Überlaufkammer ab, wenn weniger venöses Blut aus der Peripherie zuströmte als von der Pumpe weiterbefördert wurde. Kurzfristige Änderungen des Volumens in der Überlaufkammer konnten durch aktive Erhöhung bzw. Verminderung des kontraktilen Tonus der Gefäße hervorgerufen werden.

Bei Kontraktion der Venen wurde Blut aus dem Venensystem in die Überlaufkammer verdrängt, bei Erschlaffung blieb venöses Blut im Bein zurück.

Weiter wurde das Venenvolumen passiv durch die Höhe des venösen Ausflußdruckes bestimmt. Dieser war durch die Höhe der Überlaufkammer definiert. Er wurde durch Höhenverstellung der Überlaufkammer auf den gewünschten Wert eingestellt und lag bei Ruhedurchblutung zwischen 10 bis 15 mmHg.

Langfristige Änderungen des Volumens im Überlaufgefäß konnten ihre Ursache in einer Verschiebung des Gleichgewichts beim Flüssigkeitsaustausch haben. Wenn ständig Flüssigkeit aus dem intravasalen in den interstitiellen Raum strömte, sprach man von Filtration, strömte ständig Flüssigkeit aus dem Gewebe in den intravasalen Raum, von Resorption. Befanden sich Resorption und Filtration im Gleichgewicht, so lag ein isogravimetrischer Zustand vor.

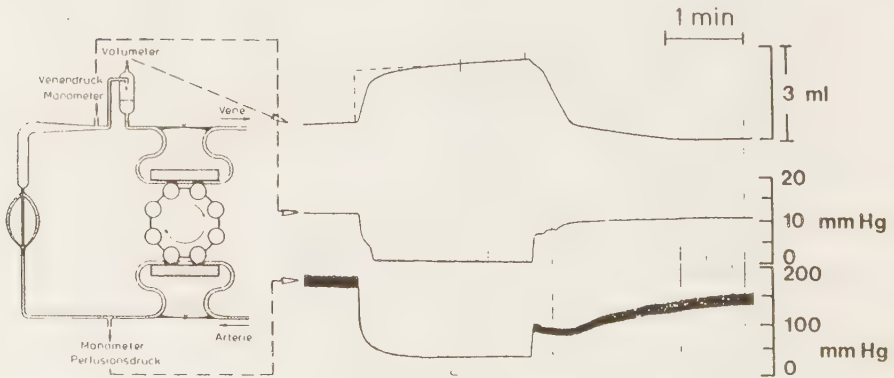


Abb.: 2 Bestimmung des Venenvolumens (nach Remien 1974)

Dargestellt ist die Volumenzunahme im Volumeter bei abgeschalteter Pumpe und einem auf 0 mmHg abgesenkten venösen Ausflußdruck ("Venendruck"). Der Perfusionsdruck sank während dieser Zeit ebenfalls auf 0 mmHg ab.

Venenvolumen. Wenn der isogravimetrische Zustand unter der Einwirkung eines Pharmakons beendet wurde, mußte man feststellen, ob dies auf einer Änderung des Venentonus oder auf einem Ungleichgewicht im Flüssigkeitsaustausch beruhte. Wie erwähnt, wiesen schnelle Änderungen auf Venenreaktionen, langsame auf eine Nettofiltration bzw. -absorption hin. In Zweifelsfällen war das Venenvolumen zu bestimmen (Abb. 2, S. 24).

Hierzu wurde die Perfusionspumpe gestoppt und die Überlaufkammer unter das Tierniveau abgesenkt. Das Blut floß dann in diese Kammer. Die Volumenzunahme in der Überlaufkammer wurde über ein Volumeter gemessen und registriert (Felix et al. 1971). Das Blut verließ die Venen nicht vollständig. Ein konstantes Restvolumen von ca. 30% blieb zurück. Da durch die Verminderung des intravasalen Drucks auch der Kapillardruck gesenkt wurde, kam es während der 3 - 3,5minütigen Messung des intravasalen Volumens zu einer Resorption aus dem Interstitium. Dieses zusätzliche Flüssigkeitsvolumen mußte bei der graphischen Ermittlung des intravasalen Volumens berücksichtigt werden (Nedopil et al. 1974).

Meßparameter und Meßgeräte. An Kreislaufparametern gemessen und fortlaufend über den Mehrkanalschreiber der Fa. Schwarzer, München, aufgezeichnet wurden der venöse Ausflußdruck, der arterielle Blutdruck des Tieres und der von der Pumpe erzeugte arterielle Perfusionsdruck. Die Perfusion wurde mit einer pulsierenden Pumpe (Ismatec-IPE-Zürich) durchgeführt. Sechs Pumpenrollen wälzten Silikonschläuche aus.

Weiter wurde über Thermistoren die Atmung registriert. Thermistoren sind Widerstände, die temperaturempfindlich sind und zur Strömungsmessung verwendet werden können (Felix 1972). Damit wurde die Luftströmung in der Trachealkanüle fortlaufend gemessen.

Zur Druckmessung dienten Kristallmembranometer der Fa. Hansen, Kopenhagen.

Die künstliche Beatmung bei Hypoxie oder Atemstillstand wurde mit einer Beatmungspumpe nach Starling vorgenommen (Fa. B. Braun).

Mit dem AVL-Gas-Check (Analysator nach K. Harnoncourt) wurden die Partialdrucke von Sauerstoff und Kohlendioxid sowie die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes bestimmt.

Venentonus. Die Größe Venentonus wurde benützt, um Aussagen über den räumlichen Querschnitt der Venen machen zu können. Eine Venentonisierung lag vor, wenn eine Vene aktiv einen geringeren Querschnitt bei konstantem Druck einstellen konnte. Der Venentonus (VT) war proportional zum Druck (P) und umgekehrt proportional zum Querschnitt (Q) (Felix 1970).

$$VT = \frac{P}{Q}$$

Der transmurale Druck (P) resultierte aus der Differenz zwischen intravasalem Druck (P_{ven}) und dem Gewebedruck P_G . Wurde unterstellt, daß sich während der Messung der Gewebedruck nicht änderte, konnte die Größe P_G vernachlässigt werden, so daß galt: $P = P_{ven}$. Da der Venenquerschnitt nicht direkt bestimmbar war, wurde der Querschnitt durch Länge (L) und Volumen (V) ausgedrückt (nach Felix 1970).

$$Q = \frac{V}{L}$$

Der Materialfaktor, der die plastischen und elastischen Eigenschaften der Venenwand ausdrückt, war in der vorliegenden Versuchsanordnung nicht bestimmbar. Wenn angenommen wurde, daß Materialfaktor und Länge der Venen (L) konstant blieben, konnten beide Faktoren (Materialfaktor und Länge) vernachlässigt werden, so daß galt (nach Felix 1970):

$$VT = \frac{P_{ven}}{V}$$

Aus Druck und Volumen konnte man so auf Reaktionen der Venen schließen (Felix et al. 1971), wenn das Volumen

- a) bei konstantem Druck abnahm
- b) bei steigendem Druck konstant blieb
- c) bei steigendem Druck abnahm

Analog war an den entgegengesetzten Vorgängen eine Erschlaffung der Venen zu erkennen.

2.1 Ödemmodell

Zum Nachweis der ödemprotektiven Wirkung der Venenpharmaka wurden die Endothelien so geschädigt, daß sie für Eiweiß durchlässig wurden. Der Endothelschaden an den Kapillaren führte zu einem eiweißreichen Ödem, an den Venen und Arterien zu einem Gefäßwandödem. Da den Venenpharmaka eine antiexsudative bzw. ödemprotektive Wirkung zugeschrieben wird, die über eine antiphlogistische Wirkung hinausgeht, sollten zur Ödemerzeugung keine Substanzen verwendet werden, die ein entzündliches Ödem hervorrufen. Unter einer Reihe von Substanzen haben wir Etacrynsäure (Hydromedin^R) gewählt, weil diese weder entzündlich wirkte, noch vasoaktiv war. Sie wurde zu 0,1% in isotoner Kochsalzlösung gelöst und schädigte das Endothel erheblich.

Nach der oben beschriebenen und von Felix und Mitarbeitern (1968, 1971, 1978, 1984) entwickelten Methode wurde eine hintere Extremität der Katze also mit konstantem Blutstrom perfundiert.

In den anfänglichen 60 - 100 Minuten der Perfusion bis zur Endothelschädigung stellte sich ein Fließgleichgewicht ein. Es wurden die Ausgangswerte der verschiedenen Parameter bestimmt: pO_2 , pCO_2 , pH, Kreislaufparameter, Venenvolumen, Eiweißgehalt im Serum (Biuret-Methode). Bei i.v.-Versuchen wurde dann, 45 Minuten vor Beginn der Endothelschädigung, das zu untersuchende ödemprotektiv wirkende Pharmakon intravenös appliziert. Fünf Minuten nach dieser Injektion wurde erneut das Venenvolumen bestimmt, um eine mögliche aktive Volumenänderung der Venen zu erfassen. Zur Eiweißmarkierung mit Farbstoff wurde Evans-blue (50 mg/kg) i. v. über eine Infusionspumpe (0,5 ml/min) 15 Minuten nach Pharmakongabe zugeführt. Evans-blue bindet sich zu nahezu 100% an Plasmaproteine.

10 Minuten nach beendeter Evans-blue-Gabe wurde erneut Blut entnommen, um über die Evans-blue-Konzentration photometrisch eine zweite Eiweißbestimmung durchführen zu können.

Zur Ödemerzeugung in der Extremität wurde die Noxe nicht i. m. oder s. c. infiltriert, sondern intraarteriell appliziert. Hierfür wurde die gleiche Perfusionstechnik angewandt, wie sie oben beschrieben ist. Die Prozedur der Endothelschädigung dauerte 30 Minuten und gliederte sich in drei Abschnitte (Abb. 3, S. 28). Während dieser Zeit war der venöse Ausflußdruck auf 0 mmHg vermindert, um den hydrostatischen Druck

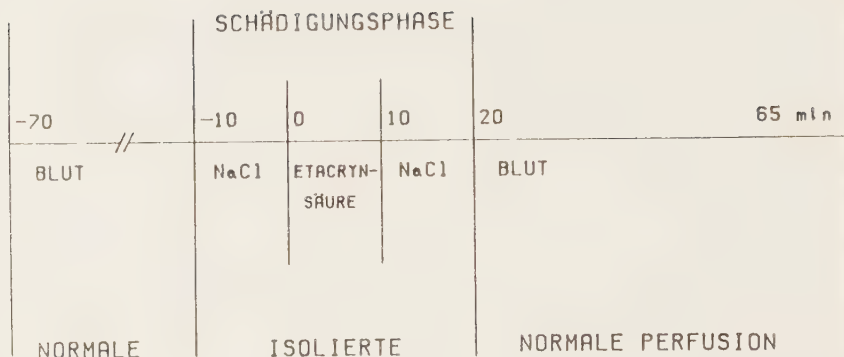


Abb.: 3 Versuchsablauf (nach Felix et al. 1983 b)

Kernstück des Versuchsablaufes war die sogenannte Schädigungsphase, während der das Bein nicht mit Blut perfundiert wurde. In einer vom Gesamtkreislauf isolierten Perfusion wurde das Bein zunächst 10 min lang mit isotoner Kochsalzlösung perfundiert. Danach erfolgte die eigentliche Endothelläsion durch Etacrynsäure, die ebenfalls 10 min lang das Bein durchströmte. Während der letzten Phase wurde die Etacrynsäure wieder mit isotoner Kochsalzlösung ausgespült.

In der anschließenden 45minütigen, wieder normalen Perfusion des Beines mit Blut bildete sich infolge der Endothelschädigung ein Ödem aus. Dessen Ausmaß in Abhängigkeit der verabreichten ödemprotektiven Substanzen war Gegenstand unserer Untersuchungen.

in den Kapillaren möglichst niedrig zu halten. So sollte ein Übertreten des Perfusats in das Gewebe verhindert werden. In der Phase der Endothelschädigung bestand keine Verbindung zwischen Bein und großem Kreislauf des Tieres.

1. Auswaschen des Blutes aus der Extremität mit isotoner Kochsalzlösung. Damit eine Bindung der ödemerzeugenden Substanz an Plasmaproteine oder etwaige Reaktionen mit Blutbestandteilen vermieden wurden, haben wir das Blut aus der Extremität mit 0,9%iger isotoner Kochsalzlösung ausgewaschen. Der venöse Ausflußdruck war auf Null gesenkt. Von der Kochsalzlösung blieben 1 - 2 ml in der Extremität. Das ausgewaschene Blut wurde wieder i. v. injiziert.

2. Perfusion der ödemerzeugenden Substanz. Die Perfusion von Etacrynsäure (0,1%) dauerte genau 10 Minuten. Die Perfusionsstärke war die gleiche wie bei der Perfusion von Blut. Das Perfusat wurde in einem Meßzylinder aufgefangen.

3. Auswaschen der ödemerzeugenden Substanz. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde Etacrynsäure mit isotoner Kochsalzlösung ausgewaschen. Die Kochsalzlösung wurde ebenfalls 10 Minuten lang mit der gleichen Stromstärke perfundiert und in einem Meßzylinder aufgefangen.

An diese Prozedur der Endothelschädigung schloß sich wieder eine normale Perfusion mit Blut an. Während Wasser schon während der Perfusion der Kochsalzlösung aus der Blutbahn in das Gewebe gelangen konnte, war ein Übertritt von Eiweiß erst mit dem Beginn der Blutperfusion möglich.

Die anschließende Blutperfusion dauerte genau 45 Minuten. Dann wurden die Tiere getötet. Muskel und Haut der Extremität wurden entnommen und ihr Gehalt an Ödemwasser und -eiweiß bestimmt.

Hierfür wurden Muskel und Haut homogenisiert, ein Teil davon 24 Stunden bei 120° C getrocknet und der Wassergehalt, bezogen auf Trockensubstanz, berechnet. In der gleichen Weise wurde mit der nicht perfundierten Extremität der anderen Seite verfahren.

Die Differenz zwischen dem Wassergehalt der ödematösen Extremität und dem der anderen Seite ergab die Menge an Ödemwasser.

Zum Nachweis der in das Interstitium übergetretenen Plasmaproteine wurde die Farbstoffmethode nach Beach und Steinetz (1961) herangezogen: Evans-blue bindet sich zu 96% an Plasmaproteine. Zur Bestimmung des Plasmaeiweißes wurden die Gewebeproben nach Beach und Steinetz zunächst mit rauchender Salzsäure mazeriert (Einwirkungsdauer 24 Std.). Dann wurde die entsprechende Menge Zephirol zugesetzt. Der sich bildende Zephirol-Evans-blue-Komplex wurde in Chloroform ausgeschüttelt und bei 620 nm photometrisch gemessen. Mit der anderen, nicht perfundierten Extremität wurde in gleicher Weise verfahren, so daß aus den

Differenzen im Eiweißgehalt schließlich die Konzentration an Ödemprotein berechnet werden konnte.

- Berechnung des Wassergehaltes in ml/g Trockengewebe:

Gewicht vor Trocknung: C_1

Gewicht nach Trocknung: C_2

Wassergehalt: $\frac{C_1 - C_2}{C_2}$ ml/g Trockengewebe

Aus der Differenz im Farbstoffgehalt der beiden Extremitäten ließ sich die Farbstoffkonzentration in der Ödemflüssigkeit errechnen. Der Farbstoffgehalt entsprach wegen seiner 96%igen Bindung an Plasmaproteine einer bestimmten Menge Plasmaprotein. Er ließ auf die Kapillarpermeabilität für Eiweiß schließen. Die für die Berechnung notwendige Größe des Eiweißgehaltes im Blut wurde nach der Biuret-Methode bestimmt.

- Berechnung der Extinktion E_o von 1 mg Protein/ml Chloroform

$$E_o = \frac{E_2 - E_1 \times 0,96}{G}$$

E_o = Extinktion von 1 mg Protein/ml Chloroform

E_2 = Extinktion des Plasmas nach Evans-blue-Gabe

E_1 = Extinktion des Plasmas vor Evans-blue-Gabe

0,96: entspricht der 96%igen Bindung des Farbstoffes an die Plasmaproteine

G = Eiweißkonzentration des Plasmas in g/100 ml, bestimmt mit der Biuret-Methode

- Berechnung des Proteingehaltes der Probenextraktion in mg

$$P = \frac{E}{E_o} \times Ch$$

P = Proteingehalt in mg

E = gemessene Extinktion der Probe

E_o = Extinktion von 1 mg Protein/ml Chloroform

Ch = aktuelle Chloroformmenge

- Berechnung des Proteingehaltes/g Trockengewicht

$$T = F \times \frac{C_2}{C_1}$$

T = Trockengewicht der aktuellen Probe in g

F = Feuchtgewicht der aktuellen Probe

C₂ = Gewicht nach Trocknung

C₁ = Gewicht vor Trocknung

$$\text{Proteingehalt/g Trockengewicht} = \frac{P}{T}$$

Um den Vorgang der Ödementstehung quantitativ und zeitlich aufzuschlüsseln, wurden folgende Abschnitte der Beinperfusion untersucht:

Akutphase der Ödementstehung. Während der Perfusion mit Etacrynsäure könnte bereits eine Erhöhung der Permeabilität in Haut- und Muskelgewebe stattgefunden haben. Um darüber Aussagen machen zu können, wurden die Mengen an Perfusionsflüssigkeit, die während der Etacrynsäureperfusion und der anschließenden Ausspülphase im Bein verblieben, registriert.

Als Differenz zwischen der definierten, ins Bein einströmenden Flüssigkeitsmenge (50 ml Etacrynsäurelösung und 50 ml Kochsalzlösung als Spülung) und der am venösen Auslauf aufgefangenen Menge konnte das im Bein verbliebene Exsudat direkt in Millilitern ausgedrückt werden. So konnten Aussagen über Flüssigkeitsverlagerungen zwischen intra- und extravasalem Raum in dieser Phase der Ödemerzeugung gemacht werden. Die im Bein zurückbleibende Flüssigkeitsmenge wurde als beginnendes Ödem betrachtet.

Chronische Phase der Ödembildung. Nach erfolgter Etacrynsäureperfusion (= Endothelschädigung) wurde das Bein wieder normal mit Blut aus dem großen Kreislauf perfundiert. In dieser Phase fand bei erhöhter Permeabilität eine anhaltende Filtration ins Interstitium statt. Diese wurde quantifiziert als filtrierte Menge in ml/min. Im Abstand von zehn Minuten nach Beginn der Perfusion (nach Schädigung) wurde die Filtrationsmenge/min aus der Volumenänderung in der Überlaufkammer bestimmt.

Gesamtmenge der Filtration. Nach 45minütiger Perfusion ließ sich aus dem Volumendefizit im Überlaufgefäß die Flüssigkeitsmenge direkt bestimmen, die während dieser Zeit im Bein als Ödem zurückgeblieben war.

Eiweißbestimmung im Serum. Zur Eiweißbestimmung wurde i. v. Blut abgenommen und zentrifugiert. Drei Proben zu je 0,1 ml Serum auf 5 ml Biuretreagenz wurden bei 545 nm photometriert.

2.2 Angewandte Substanzen und Pharmaka

- Chloralose
- Ketanest^R (1 ml entspricht 10 mg)
- Biuret Reagenz
- Evans-blue
- Propandiol 1,2 = 1,2 Propylenglykol
- Polyäthylenglykol
- Heparin (Liquemin^R)
- Etacrynsäure (Hydromedin^R)

Etacrynsäure wurde als 0,1%ige Lösung (50 mg Etacrynsäure auf 50 ml Kochsalzlösung) unmittelbar vor Versuchsbeginn angesetzt. Verwendet wurde das Medikament Hydromedin^R.

- Ruscus-aculeatus-L.-Extrakt (Liliaceae-Asparagoideae)

Die Stechmyrte oder auch stechender Mäusedorn genannt, Ruscus aculeatus L., wächst vornehmlich im Mittelmeergebiet als kleiner bis 1 m hoch werdender Halbstrauch. Von Interesse für die Therapie sind die unterirdischen Wurzelstöcke. Aus diesen Rhizomen, die im Frühjahr geerntet werden, wird der Extrakt gewonnen. Darin findet sich ein Gemisch von Steroidsaponinen unterschiedlicher quantitativer Zusammensetzung (Müller 1973).

- Ruscogenin

1955 gelang es Sannie und Lapin in einem Extrakt aus Rhizomen des *Ruscus aculeatus* ein Gemisch zweier Steroidsapogenine zu isolieren, die als Ruscogenin und Neoruscogenin bezeichnet wurden (Seidenberger et al. 1974).

Ruscogenin gehört zu den sogenannten Saponinen, die in zahlreichen Pflanzenfamilien auftreten. Der Name rührt von einer charakteristischen Eigenschaft dieser Stoffe, mit Wasser wie Seife (lat. *sapo* = Seife) zu schäumen, her. Zuordnung von Naturstoffen zur Klasse der Saponine erfolgt im wesentlichen auf Grund dieser Oberflächenaktivität. Als glykosidische Pflanzenstoffe bestehen Saponine aus einem Grundkörper (Genin, Sapogenin) und einem variablen Zuckeranteil.

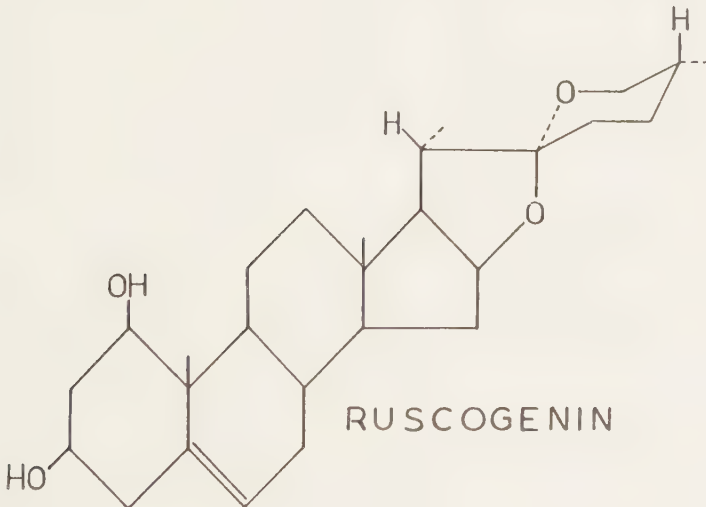


Abb.: 4 Ruscogenin-Strukturformel

Die Saponine werden nach Tschesche und Wulff (1964) je nach Geninstruktur in drei Gruppen eingeteilt.

- Spirostanoglykoside (= Steroidglykoside)
- Steroidalkaloidglykoside
- Triterpenglykoside

Ruscogenin zählt zur Gruppe der Spirostanoglykoside und besitzt die Strukturformel:



In der Pflanze liegt Ruscogenin nicht frei vor, sondern ist über die 3β -OH-Gruppe glykosidisch an Rhamnose und Arabinose gebunden (Müller 1973). Sowohl im uns vorliegenden Extrakt aus *Ruscus aculeatus* als auch als "Ruscogenin als Einzelsubstanz" liegt Ruscogenin in seiner geninen Saponinform, d. h. ohne Zuckeranteil vor (Mitteilung der Fa. Lipha über Phlebodril^R 1982).

Als Lösungsmittel für Ruscogenin verwendeten wir sowohl zur intravenösen wie zur oralen Applikation Polyäthylenglykol, da Ruscogenin wasserunlöslich ist.

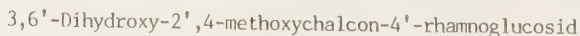
Intravenös war die Lösung 2%ig, oral 1%ig.

- Trimethylhesperidin-chalcon (TMHC)

TMHC ist ein halbsynthetisches Derivat des Hesperidins. In seiner Flavononform ist Hesperidin in Wasser unlöslich. Das Chalconderivat erhält man durch Methylierung der Phenolgruppe mit Methylsulphat in alkalischem Milieu. TMHC ist definiert (Chanal et al. 1981) als das wasserlösliche Produkt, das man nach Methylierung von Hesperidin erhält.

Szent-Györgyi und Mitarbeiter machten 1936 erste Erfahrungen mit dieser Gruppe von "Flavonoiden", die sie später als "Citrin" aus Paprika und Zitrusfrüchten isolierten (Hofmeister 1970). Dieses "Citrin" besteht aus einem Gemisch von Eriodictin und Hesperidin. Beide Verbindungen gehören zur Gruppe der Flavonoglykoside (Böhm 1967).

Hesperidin ist 5,7,3'-Trihydroxy-7'-methoxy-flavonon-7-rhamnoglycosid. Das von uns verwendete TMHC hat die chemische Bezeichnung:



Dieses stabilisierte Chalcon kann sich nicht mehr tautomer durch Lösen der $\text{C}_2\text{-C}_3$ -Doppelbindung in Hesperidin umlagern, wie dies dem Hesperidin-

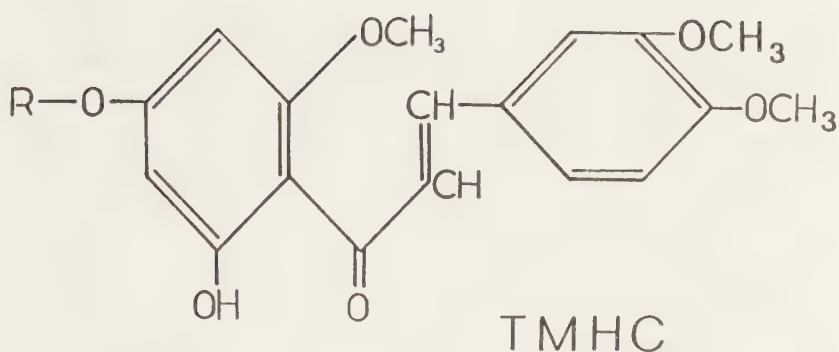


Abb.: 5 TMHC-Strukturformel, R = Rhamnose

chalcon durch die freie C₉-OH-Gruppe bei günstigen pH-Werten noch möglich ist (Seidenberger et al. 1974).

TMHC wurde 2%ig gelöst in isotoner Kochsalzlösung intravenös verabreicht. Zur oralen Gabe diente eine wässrige Lösung.

- Intravenöse Applikation der Pharmaka. Die in Kochsalzlösung bzw. Polyäthylenglykol gelösten Pharmaka wurden in die Vena femoralis injiziert.
- Orale Applikation. Bei oraler Applikation wurden die Pharmaka zum Zeitpunkt der Narkotisierung ebenfalls über Magensonde zugeführt. Zwischen oraler Zuführung der Pharmaka und dem Zeitpunkt ihrer Wirkungsprüfung, der mit der Endothelschädigung begann, lagen so etwa 4 Stunden.

2.3 Kombinierte Anwendung von TMHC und Ruscus-Extrakt

Die beiden Substanzen wurden intravenös und oral auch in Kombination gegeben. Bei intravenöser Applikation verwendeten wir TMHC und Ruscus-Extrakt in den Mischungen 10 mg TMHC/kg und 10 mg Ruscus/kg, 10 mg TMHC/kg und 20 mg Ruscus/kg, 20 mg TMHC/kg und 20 mg Ruscus/kg. Die Substanzen waren 2%ig in isotoner Kochsalzlösung gelöst. Für orale Versuche gaben wir TMHC und Ruscus-Extrakt in einer Mischung von 100 mg TMHC/kg und 200 mg Ruscus/kg.

2.4 Statistische Methoden

Signifikanzberechnungen wurden mit Hilfe des t-Testes nach Student ausgeführt. Dabei kam der Test für verbundene und unverbundene Stichproben zur Anwendung (Sachs 1971). Zur Berechnung diente der Mikrocomputer Hewlett Packard 97 Calculator.

2.5 Abkürzungen

TMHC	= Trimethylhesperidinhalcon
Rusc	= Ruscus = Ruscus-aculeatus-L.-Extrakt
S_F	= Standarderror
$\bar{x}$	= Mittelwert
P_{Perf}	= arterieller Perfusionsdruck
RR	= mittlerer arterieller Druck in mmHg
PÄG	= Polyäthylenglykol

Signifikanzniveau:

*	: $p < 0,05$
**	: $p < 0,01$
***	: $p < 0,001$
****	: $p < 0,0001$

2.6 Diskussion der Methode

Die Tiere wurden mit 60 mg/kg Chloralose narkotisiert. Hierzu wurde die Chloralose in Wasser gelöst, um über eine Magensonde oral appliziert werden zu können. Der Nachteil dieser Methode war, daß durch den langsamen Wirkungseintritt der Versuchsbeginn 1 - 2 Stunden verzögert wurde. Eine i. v.-Gabe wäre in dieser Hinsicht sicher günstiger gewesen. Allerdings hatte die orale Applikation den entscheidenden Vorteil, daß über den gesamten Versuchsverlauf eine gleichmäßige Anflutung der Chloralose im Blut eine gleichbleibend tiefe Narkose unterhielt. Die Dosis war bei einer einmaligen Gabe für den gesamten Versuch ausreichend.

Eine Übersicht über systemische und zentralnervöse Wirkungen der Chloralose wurde von Balis und Monroe 1964 veröffentlicht. Eine Beeinflussung des vegetativen Nervensystems und insbesondere von Kreislaufreflexen wurde bei i. v.-Gabe der Chloralose vorwiegend an Hunden beobachtet (Bass, Buckley 1966).

Bei Versuchen an Katzen mit oraler Chloralosegabe sprachen einige Befunde für eine Beeinflussung der Kreislaufregulation (Remien 1974): Die Pulsfrequenz war nach diesen Untersuchungen ebenso wie der Blutdruck im Vergleich zu Normalwerten nicht narkotisierter Katzen leicht erhöht, was für einen erhöhten sympathischen Tonus spricht. In weiteren Versuchen wurde jedoch nur ein geringer Einfluß auf den peripheren Widerstand festgestellt. Einige eigene Versuche mit Chloralose, 5%ig in Propandiol-1,2 gelöst, ergaben, daß der Wirkungseintritt nach oraler Gabe zwar beschleunigt wurde, daß aber die antiödematöse Wirkung des Propandiol-1,2 eine vergleichende Untersuchung unserer Pharmaka beeinträchtigte. Die antiödematöse Wirkung des Propandiols wurde auch von Gross (1950) beschrieben.

Die isolierte Perfusion des Katzenhinterlaufes zur Ödemerzeugung und die Messung der verschiedenen Kreislaufparameter machten es erforderlich, bei der Präparation eine vollständige Unterbindung arterieller und venöser Kollateralkreisläufe zu erreichen. Dies geschah durch Ligatur sämtlicher arterieller und venöser Abzweigungen der Arteria und Vena iliaca sowie der A. und V. femoralis bis etwa 5 cm distal des Ligamentum inguinale. Um eine Verbindung des Lymphsystems vom Bein zum Gesamtkreislauf zu vermeiden, wurde die Oberschenkelmuskulatur durch 5 mm breite PVC-Bänder unterbunden. Zur Überprüfung der vollständigen Unterbindung sämtlicher Kollateralen war die Bestimmung

des intravasalen Volumens geeignet. Waren alle Kollateralkreisläufe unterbunden, näherte sich die Volumenkurve in ihrem flachen Teil (Abb. 2, S. 24) einer Geraden, die nur gering von der Horizontalen abwich. Diese Annäherung war nach spätestens 2 Minuten erreicht und Ausdruck der einsetzenden Absorption bei niedrigem intravasalen orthostatischen Druck. War diese stetige Volumenzunahme größer als die zu erwartende Absorptionsrate, war dies ein Zeichen für einen noch bestehenden Kollateralkreislauf. Des weiteren sank bei Bestimmung des intravasalen Volumens der arterielle Perfusionsdruck auf 0 mmHg oder negative Werte: Daraus konnte auf die Dichtigkeit der arteriellen Kollateralen geschlossen werden, denn schon geringste Strömungen führten zu einem meßbaren Druck im arteriellen System. Um den physiologischen Gefäßtonus möglichst zu erhalten, wurden Nervus femoralis und Nervus ischiadicus geschont und nicht unterbunden.

Die Verwendung einer Rollenpumpe garantierte eine konstante Perfusion des Beines. Die Amplituden und die Frequenz der resultierenden Perfusionsdruckschwankungen bei der pulsierenden Strömung waren etwas geringer als die des Blutdrucks. Die Höhe des Perfusionsdrucks wurde über Regulierung der Umdrehungszahl der Pumpe auf die Höhe des Blutdrucks eingestellt. Aus früheren Versuchen (Remien 1974) war bekannt, daß die Rollenpumpe wesentlich zu einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Plasma beizutragen scheint. So war zwei Stunden nach Beginn der Perfusion die Hb-Konzentration um $32 (\pm 6)$ mg% angestiegen, 4 Stunden danach um $50 (\pm 21)$ mg%. Jedoch dürfte auch der operative Eingriff neben der Wirkung der Pumpe einen Einfluß auf den Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Versuchsverlauf gehabt haben.

- Perfusionsdruck. Bei den Versuchen konnte ein Anstieg des Perfusionsdrucks um etwa 5 - 10 mmHg pro Stunde beobachtet werden. Abdel-Sayed et al. (1970) fanden sowohl an der innervierten wie an der denervierten Pfote eine Abhängigkeit des Perfusionsdruckes von der Temperatur. Als Erklärung dafür kann gelten (Webb-Peploe, Shepherd 1968), daß an oberflächlichen Hautvenen bei Abkühlung die Affinität der alpha-Adrenozeptoren für Noradrenalin anwächst: Abkühlung führe deshalb an oberflächlichen Venen zu Konstriktion. An tiefen Venen trete ein gegenteiliger Effekt auf: Die Reaktion auf NA werde bei Abkühlung schwächer, so daß es zur Dilatation der tiefen Venen komme (Vanhoutte, Janssens 1978, Janssens et al. 1981, Shepherd et al. 1983). Um die Tiere vor Abkühlung zu schützen, wurde deshalb die Tischplatte auf 37° C konstant

gehalten. Besonders die relativ große extrakorporale Strecke (ca. 10 ml Blutvolumen) erforderte eine geregelte Temperatur, um Einflüsse der Temperatur auf periphere Gefäßreaktionen auszuschließen.

Bei Ausbildung eines interstitiellen Ödems, wie z. B. bei Kontrollversuchen ohne Pharmakon, bewirkte der steigende hydrostatische Druck im Interstitium einen erhöhten peripheren Widerstand, was sich in einer teils ausgeprägten Steigerung des Perfusionsdrucks (bis zu 250 mmHg) zeigte.

Zu dieser Erhöhung des peripheren Widerstandes bei Kontrollversuchen könnten auch die massiven strukturellen Veränderungen in der Endstrombahn führen, die durch Etacrynsäure hervorgerufen werden (Hammersen, Hammersen 1983 a). Dabei wiesen die Autoren darauf hin, daß die erfaßten histologischen Befunde des Etacrynsäureödems für eine nicht entzündliche Natur des Etacrynsäureödems sprächen. Die Untersuchungen der zitierten Arbeit beziehen sich auf die Extremitätenmuskulatur der Katze. Durch blasige Endothelaufreibungen und durch Thrombozytenaggregation werde das Lumen der terminalen Gefäße teils vollständig verlegt. Diese Verringerung des Strömungsquerschnittes könnte, obwohl histologisch keine direkten Gefäßverschlüsse beobachtet wurden, zu diesem Anstieg des Perfusionsdruckes beitragen.

- Bestimmung des Venenvolumens. Die beschriebene Erfassung des intravasalen Volumens ermöglichte eine rasche und einfache Volumenbestimmung, die wiederholbar und deren quantitatives Ergebnis registrierbar war. Die während der Messung herrschende Ischämie im Bein (ca. 3 min) war nach kurzer Zeit wieder kompensiert, wie Messungen der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz (Remien 1974) ergaben. Die reaktiv nach der Messung einsetzende Hyperämie war an einem verzögerten Anstieg des Perfusionsdruckes auf den Wert vor der Perfusionsunterbrechung zu erkennen (Abb.2, S. 24). Das gemessene Blutvolumen stammte aus Gefäßabschnitten, die physiologisch-anatomisch in der Lage waren, ihre Querschnitte passiv verändern zu lassen, was in unserem Fall durch Absenken des intramuralen Drucks erfolgte. Gefäße, die nicht kollabieren konnten, wurden nicht in diese Volumenbestimmung mit einbezogen. Nach Untersuchungen von Eriksson und Lisander (1972) konnte an isolierten Muskeln der Katzenextremität auch bei niedrigem intravasalen Druck kein Kollaps der Kapillaren im Gegensatz zu den Venulen beobachtet werden. Das läßt den Schluß zu, daß von der oben beschriebenen Methode der intravasalen Volumenbestimmung im wesentlichen die Gefäß-

gebiete der kapazitiven Venen und Venulen erfaßt wurden. Die Reproduzierbarkeit der Volumenbestimmung war nach Untersuchungen von Remien et al. (1974) mit dieser Methode gut. Allerdings änderte sich das Volumen bei innervierten Extremitäten im Versuchsverlauf stärker als bei denervierten.

- Einfluß der Beinspülung auf die Kapillarpermeabilität. Während der 30 Minuten dauernden Beinspülung war das Bein ischämisch, das heißt, Gasaustausch und -transport auf dem Blutweg konnten nicht stattfinden. Felix (1978) untersuchte speziell die Auswirkung dieser Ischämiedauer auf die Kapillarpermeabilität, indem bei gleichem Versuchsablauf während der Phase der Ödemerzeugung 30 Minuten lang lediglich Kochsalzlösung perfundiert wurde und keine ödematös wirkende Substanz zur Anwendung kam: Weder Eiweiß- noch Flüssigkeitsgehalt im Interstitium des perfundierten Beines unterschieden sich signifikant von denen des anderen nicht perfundierten Beines.
- Evans-blue als Eiweißmarker. Um den Anteil des ins Interstitium filtrierten Plasmaproteins zu messen, diente uns Evans-blue als Indikator. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Gefäßendothelien auch unter physiologischen Bedingungen in geringem Ausmaß für Proteine durchgängig sind.
Bei einer Konzentration von 2% war Evans-blue zu 96% an Plasmaproteine gebunden. Der ungebundene Anteil des Farbstoffes blieb bei der Messung unberücksichtigt. Man kann aber davon ausgehen, daß dieser ungebundene Anteil ins Interstitium diffundierte und an Gewebeproteine gebunden wurde (Le Veen, Fischman 1947).
Sowohl die geringe physiologische Proteinpermeabilität als auch die Bindung von Evans-blue an Gewebeproteine ist an beiden Beinen gleichermaßen ausgebildet, so daß sich die entstehenden Fehler rechnerisch eliminieren lassen.
- Gewinnung der Haut- und Muskelproben. Die rasierte Haut wurde sorgfältig an Ober- und Unterschenkel beider hinterer Extremitäten abpräpariert. Wegen der unterschiedlich ausgeprägten Gefäßversorgung von Cutis und fettgewebereicherer Subcutis war das Eiweiß- und Flüssigkeitsödem der Haut in deren Schichten unterschiedlich stark ausgeprägt. Dementsprechend konnte der Ödembefund an der Haut durch die Dicke der abpräparierten Haut beeinflusst sein. Es wurde deshalb darauf geachtet, die Haut so von der Muskelfaszie abzutrennen, daß die Fettanteile der

Subcutis nicht am Hautgewebe belassen wurden.

Eine Folge der unterbundenen Kollateralkreisläufe, insbesondere von Arteria profunda femoris und A. circumflexa femoris, konnte Grund für eine unterschiedliche Blutversorgung verschiedener Hautareale sein. Die Ausbildung von Flüssigkeits- und Eiweißödem konnte dadurch ebenfalls lokal unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Deshalb wurden die Hautstücke in kleine, $0,5 - 1 \text{ cm}^2$ große Stückchen geschnitten und dann erst in zwei Anteile zur Eiweiß- und zur Flüssigkeitsbestimmung getrennt. Durch die zufallsgemäße Verteilung der Hautstücke auf zwei Gruppen kam die lokal ungleichmäßige Ausprägung des Flüssigkeits- und Eiweißödems nicht zur Geltung.

An der Muskulatur wurde ebenfalls eine unterschiedliche Anfärbung durch mit Evans-blue markierte Proteine beobachtet. Die Ursache dafür dürfte auch in der Unterbrechung arterieller und venöser Kollateralkreisläufe gelegen haben. So wurde am M. gastrocnemius bei allen Tieren eine gleichmäßige Anfärbung beobachtet, in der Intensität abhängig vom Grad des Ödems, an den Mm. sartorius et gracilis hingegen eine von Tier zu Tier unterschiedliche. Die Muskulatur von Ober- und Unterschenkel wurde abgenommen und mit einem Homogenisator zu Brei zerkleinert. Auf diese Weise entstand eine einheitlich angefärbte Masse; die Unterschiede zwischen den einzelnen Muskeln bezüglich Ausprägung von Flüssigkeits- und Eiweißödem waren ausgeglichen. Die von Tier zu Tier unterschiedlichen Fettablagerungen zwischen den einzelnen Muskelbündeln wurden vor der Homogenisierung entfernt und verworfen, ebenso Sehnenanteile.

- Einflüsse der Lösungsmittel der Pharmaka

Soweit die Pharmaka in Wasser, bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung löslich waren, wurden sie in Wasser gelöst oral verabreicht. Dies war der Fall bei Chloralose, TMIC und Ruscus-Extrakt. Der Versuch, Chloralose in Propandiol zu lösen, um eine schnellere Resorption und frühzeitigere Narkosewirkung zu erzielen, wurde nach 4 Versuchen abgebrochen, da durch Propandiol eine signifikante ($p < 0,01$) ödemhemmende Wirkung erhalten wurde (siehe 3.1.1). Für die i. v.-Gabe der wasserlöslichen Pharmaka wurde isotone Kochsalzlösung verwendet, so bei TMIC und Ruscus-Extrakt. Bei Kontrollversuchen wurde zum Zeitpunkt "Pharmakon" die entsprechende Menge Kochsalzlösung injiziert. PÄG diente als Lösungsmittel für Ruscogeningabe, intravenös und oral. Für beide Applikationswege wurden Kontrollversuche durchgeführt. Ein Einfluß auf die untersuchten Parameter (siehe Ergebnisse) konnte nicht beobachtet werden.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Kontrollen

In der angegebenen Versuchszahl von 93 sind 20 Kontrollversuche enthalten. Bei Kontrollversuchen wurde bei ansonsten gleichem Versuchsablauf kein ödemprotektives Pharmakon gegeben. Die Perfusion mit Etacrynsäure fand hingegen statt und hatte am perfundierten Bein ein eiweißreiches Haut- und Muskelödem zur Folge. Anstelle eines ödemprotektiven Pharmakons wurde den Tieren das Lösungsmittel allein verabreicht. Als Lösungsmittel wurden 0,9%ige Kochsalzlösung und PÄG verwendet. 15 - 20 Minuten nach Perfusionsbeginn wurden 6 ml NaCl (durchschnittliche Menge der Pharmakonlösungen) oder 2 ml PÄG injiziert. Dabei wurden Kreislaufparameter registriert und das intravasale Volumen des Versuchsbeines vor und nach Injektion bestimmt. Im Sinne oraler Pharmakongabe wurden Kochsalzlösung und PÄG in entsprechenden Mengen (siehe oben) auch oral in Kontrollversuchen verabreicht.

Für den Muskel ließ sich ein Gehalt an Ödemprotein von 10,01 ($\pm 0,41$) mg/g Trockengewicht nachweisen (n = 16).

An der Haut lag dieser Wert bedeutend niedriger: Der Proteingehalt betrug hier 1,99 ($\pm 0,33$) mg/g Trockengewicht. Der Flüssigkeitsgehalt des Ödems betrug im Muskelgewebe 0,76 ($\pm 0,07$) ml/g Trockengewicht.

An der Haut erhielt man einen Ödemflüssigkeitsgehalt von 0,48 ($\pm 0,04$) ml/g.

Diese Werte erscheinen in den Ergebnistabellen jeweils im Vergleich zu den Ödemwerten der Verumversuche.

- 3.1.1 Propandiol-1,2 als Lösungsmittel der Chloralose (n = 4). Mit dem Ziel, eine schnellere Resorption des Narkotikums Chloralose zu erreichen, wurde der Versuch unternommen, Propandiol-(1,2) = 1,2-Propylenglykol als Lösungsmittel zu verwenden. In 4 Kontrollversuchen erzielten wir Ergebnisse, die eine antiödematöse Wirkung dieses Lösungsmittels wahrscheinlich machen.

Tab.: 1 Kontrollen mit Propandiol-1,2 als Lösungsmittel der Chloralose (n = 4)

mg Ödemprot./g Trock.gew.		ml Ödemflüss./g Trock.gew.	
Muskel	Haut	Muskel	Haut
$\bar{x}$ 3,96	0,60	0,60	0,33
$S_E(^+0,81)$	$(^+0,19)$	$(^+0,20)$	$(^+0,12)$

Aus Tab. 1 ergeben sich signifikante Unterschiede zu den übrigen Kontrollversuchen im Bereich Ödemproteingehalt in Muskelgewebe und Hautgewebe ($p < 0,01$, $p < 0,05$). Die Werte für den Ödemflüssigkeitsgehalt sind nicht signifikant unterschiedlich zu den entsprechenden Kontrollversuchen ohne Propandiol-1,2.

Dieser Unterschied im Ödemproteingehalt ist im Sinne einer antiödematösen Wirkung dieses Lösungsmittels interpretierbar. Deshalb wurden keine weiteren Versuche mit Pharmakon und Propandiol-1,2 als Lösungsmittel der Chloralose durchgeführt.

1.2 Auswirkung der Etacrynsäureperfusion. Durch Etacrynsäure wurde an Haut- und Muskelgewebe die Permeabilität für Flüssigkeit und Proteine erhöht. Aus der Versuchsbeschreibung geht hervor, daß die Etacrynsäure nur an einer hinteren Extremität perfundiert wurde. Die andere diente als Vergleich, indem bei Haut- und Muskelproben Proteingehalt und Flüssigkeitsgehalt dieser Extremität als Nullwerte genommen wurden.

Um die Einflüsse der Etacrynsäure auf den transkapillären Stoffaustausch an Haut und Muskulatur gesondert zu ermitteln, wurde das erzeugte Ödem des perfundierten Beines mit den Flüssigkeits- und Proteinwerten des nicht perfundierten Beines verglichen.

Nach Etacrynsäureperfusion und anschließend wieder normaler Blutperfusion erhöhte sich an Muskel- und Hautgefäßen die Permeabilität für Plasmaproteine massiv. Im Muskelgewebe stieg der Plasmaproteingehalt auf den fast 7-fachen Wert, von 1,68 auf 11,61 mg/g Trockengewicht. Dieser Anstieg war mit $p < 0,0001$ signifikant. Zu einem ebenfalls signifikanten ($p = 0,004$) Anstieg der Plasmaproteine führte die Etacrynsäureperfusion auch im Hautgewebe. Diese nahmen um 67%, von 2,94 auf 4,92 mg Plasmaprotein/g Trockengewicht zu. Der geringere Permeabilitätszuwachs in der Haut mag damit zu erklären sein, daß

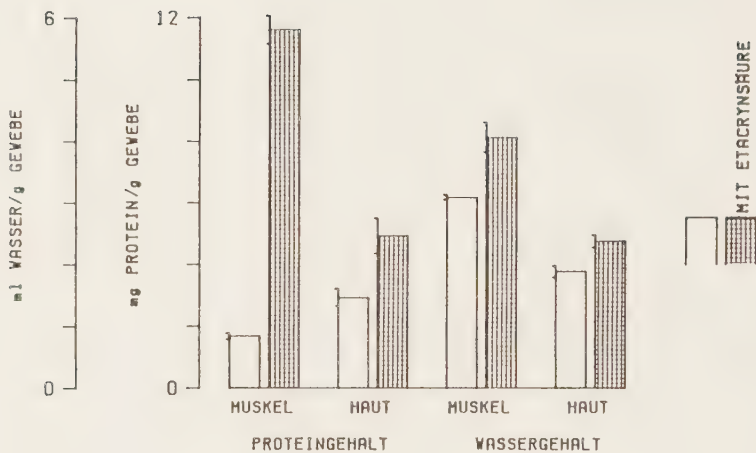


Abb.: 6 Auswirkung der Etacrynsäureperfusion auf den Gehalt an Plasmaprotein und Flüssigkeit in Haut- und Muskelgewebe. Verglichen werden Haut- und Muskelgewebe des mit Etacrynsäure perfundierten Beines und des nicht perfundierten Beines.

die Hautperfusion/100 g Gewebe und min geringer war als die im Muskelgewebe. Diese geringere Hautperfusion dürfte mit der unterschiedlichen Bedeutung der Haut für die Wärmeregulation bei dicht behaarten (z. B. Katze) und wenig behaarten Säugetieren zusammenhängen. Somit dürfte auch die Schädigung mit Etacrynsäure, auf die die Permeabilitätssteigerung zurückgeführt werden mußte, an Hautgefäßen geringer gewesen sein (siehe Diskussion).

Tab.: 2 Kontrollen mit Etacrynsäure, Werte des perfundierten und des nicht perfundierten Beines (n = 16)

mg Plasmaprotein/g Trockengewicht			
Muskel		Haut	
nicht perf.	perf.	nicht perf.	perf.
$\bar{x}$ 1,68	11,61	2,94	4,92
$S_E(^{+0,10})$	$(^{+0,45})$	$(^{+0,28})$	$(^{+0,57})$

ml Flüssigkeit/g Trockengewicht			
Muskel		Haut	
nicht perf.	perf.	nicht perf.	perf.
$\bar{x}$ 3,09	4,07	1,88	2,37
$S_E(^{+0,04})$	$(^{+0,24})$	$(^{+0,09})$	$(^{+0,10})$

Der Flüssigkeitsgehalt/g Trockengewicht nahm nach Etacrynsäureperfusion weniger stark zu als der Proteingehalt, im Muskel um 32% von 3,09 auf 4,07 ml/g Trockengewicht ($p = 0,0004$). Im gleichen Ausmaß stieg der Flüssigkeitsgehalt in der Haut um 26%, von 1,88 auf 2,37 ml/g Trockengewicht. Auch dieser Unterschied war mit $p < 0,001$ signifikant.

- Perfusionsdruck: Während der 45minütigen Blutperfusion des Beines, die an die Schädigungsphase durch Etacrynsäure anschloß, konnte ein Anstieg des Perfusionsdruckes beobachtet werden. Zunächst war ein verzögerter Anstieg auf den Wert vor der Unterbrechung der Blutperfusion zu erkennen. Dies dürfte auf eine kurzzeitige reaktive Hyperämie zurückzuführen gewesen sein (Remien 1974). Danach ließ sich eine kontinuierliche Steigerung des Perfusionsdruckes registrieren, die bei den 16 Tieren zu einem mittleren Anstieg um 100,6% ($S_E - ^{+19,9\%}$) führte. Die Gründe dafür dürften in den bereits beschriebenen strukturellen Veränderungen der Endstrombahn durch die Schädigung mit Etacrynsäure

gelegen sein. Zusätzlich zu den intravasalen Strömungshindernissen dürfte die Ausbildung des interstitiellen Ödems eine Erhöhung des peripheren Widerstandes bewirkt haben. Man sollte also erwarten können, daß eine pharmakologische Minderung dieses Ödems auch positive Auswirkungen auf den peripheren Widerstand und damit auf den arteriellen Perfusionsdruck hatte.

- Zusammenfassung: Etacrynsäure erhöhte in Muskel- und Hautgewebe die Permeabilität der Kapillaren für Proteine und Flüssigkeit unterschiedlich stark. Die Permeabilität für Plasmaproteine nahm im Muskel um nahezu 600%, in der Haut um 67% zu. Die Flüssigkeitspermeabilität im Muskel stieg um 32%, in der Haut um 26%.

3.2 Dynamik der Ödementstehung

Nach Abschluß der Etacrynsäureperfusion konnte davon ausgegangen werden, daß das Endothel der Bein Gefäße geschädigt war. Dies drückte sich in einer erhöhten Permeabilität für Flüssigkeit und Proteine aus. Auch die isotone Kochsalzlösung, mit der die Etacrynsäure während einer 10minütigen Perfusion aus dem Bein ausgespült werden sollte, traf auf bereits geschädigte Endothelien. Es fand deshalb schon während dieser Ausspülphase eine pathologisch erhöhte Filtration ins Interstitium statt. Aufschluß darüber gab die Differenz aus der definierten, ins Bein eingeströmten und der aus dem Bein venös ausgeströmten Kochsalzmenge. Mit der Blutperfusion, die sich an die Schädigungs- und Ausspülphase anschloß, setzte auch die Filtration von Proteinen ein. Während der 45minütigen Blutperfusion bildete sich in Haut- und Muskulatur des Beines ein eiweißreiches Ödem. Dieses gab durch sein Ausmaß Aufschluß über den Grad der Endothelschädigung und über den ödemprotektiven Einfluß der verabreichten Pharmaka.

Um die Wirkung der Pharmaka auf die Entstehung des Ödems näher zu beleuchten, wurden folgende Abschnitte der Ödembildung unterschieden:

Akutes Ödem: Die bei der Etacrynsäureperfusion und der anschließenden Ausspülung mit isotoner Kochsalzlösung im Bein zurückgebliebene Flüssigkeitsmenge (in ml) wurde als akutes Ödem bezeichnet. Methodisch bedingt war dies die eiweißfreie Phase der Ödengenese.

Filtration₁₀: Filtration in ml/min zum Zeitpunkt 10 min nach Beginn der Blutperfusion (anschließend an Phase der Etacrynsäureschädigung).

Filtration₃₅: Filtration in ml/min, 35 min nach Beginn der Blutperfusion

Gesamtfiltration:

Gesamtes filtrierte Volumen während der an die Schädigungsphase anschließenden Blutperfusion (45 min).

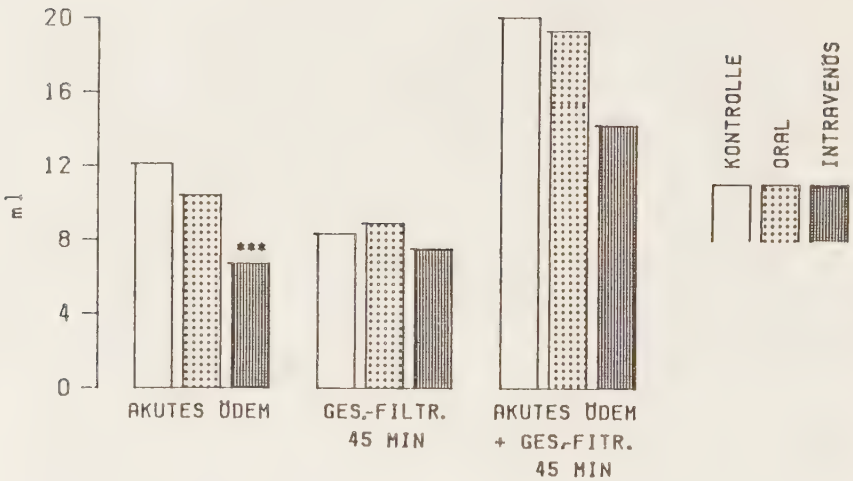


Abb.: 7 Dynamik der Ödementstehung: Einfluß der Applikationsform

Erklärung der Begriffe "Akutes Ödem" und "Ges.-Filtr. 45 Min" = "Gesamtfiltration in 45 min" im Text.

Abgebildet sind die Mittelwerte der Absolutmengen an Flüssigkeit in ml, die jeweils für "Akutes Ödem" und "Gesamtfiltration in 45 min" bestimmt wurden. Die Summe aus "Akutes Ödem" und "Gesamtfiltration in 45 min" (Akutes Ödem + Ges.-Filtr. 45 Min) entspricht der durchschnittlichen Menge an Ödemflüssigkeit, die bei Versuchsende im Bein zurückgeblieben war.

Verglichen wurden Kontrollen (n = 16) mit der Gesamtzahl der intravenösen (n = 54) und oralen (n = 40) Versuche der Pharmaka TMIC, Ruscus und Ruscogenin.

Die Unterschiede im Bereich "Akutes Ödem" zwischen intravenöser und oraler Applikationsform lassen auf unterschiedliche ödemprotektive Wirkmechanismen schließen.

*** : p < 0,0001 gegen Kontrollen

*** : p < 0,002 gegen orale Versuche

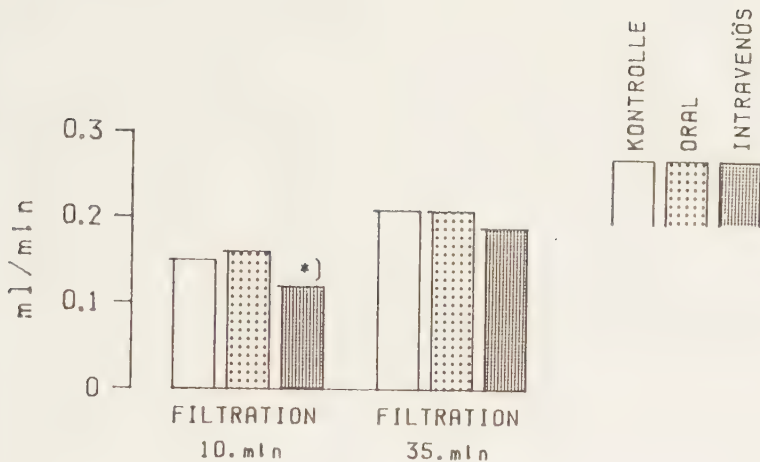


Abb.: 8 Dynamik der Ödementstehung: Einfluß der Applikationsform

Die intravenöse Applikationsform hatte einen deutlichen Einfluß auf die Gefäßpermeabilität, der jedoch im Verlauf des Versuches schwächer wurde. Dargestellt sind die Filtrationsmengen in ml/min 10 Minuten (Filtr. 10 min) und 35 Minuten (Filtr. 35 min) nach Beginn der 45minütigen Beinperfusion im Anschluß an die Schädigungsphase.

*) $p < 0,07$ gegen orale Versuche

Einfluß der Pharmaka. (Tab. 3,4). Um zu sehen, ob und an welchem Punkt der Ödementwicklung durch Pharmaka Einflüsse deutlich werden, wurden die oben angeführten Parameter akutes Ödem, Filtration₁₀, Filtration₃₅ und Gesamtfiltration in 45 min in Kontrollversuchen und Verumversuchen verglichen. Die Verumversuche wurden in zwei große Gruppen zusammengefaßt, in i. v.-Versuche und Oral-Versuche. Sie rekrutierten sich aus der Gesamtzahl der intravenösen und oralen Applikationen von TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin. Folglich konnte nur ein allgemeiner Trend der Pharmaka, nicht hingegen ein pharmakonspezifischer Ansatzpunkt der antiödematösen Wirkung aufgezeigt werden.

Tab.: 3 Dynamik der Ölementstehung
Kontrollversuche (n = 16)
i. v.-Versuche (n = 54)

		Kontr.	i. v.	Diff.	p
akut. öd.	ml	12,1	6,7	44%	0,0001
Filtr. ₁₀	ml/min	0,15	0,12	20%	n. s.
Filtr. ₃₅	ml/min	0,21	0,19	9%	n. s.
Ges.filtr. 45 min	ml	8,3	7,5	9,3%	n. s.

- Intravenöse Versuche. (Abb. 7, 8; Tab. 3) Der deutlichste Unterschied zwischen Kontrollversuchen und i. v.-Versuchen kam in der Höhe des akuten Ödems zum Ausdruck. Es betrug bei Kontrollen durchschnittlich 12,1 ml. Bei i. v.-Versuchen war es um 44% geringer ($p < 0,0001$) und lag bei nur 6,7 ml. Ein ebenfalls großer, allerdings nicht signifikanter Unterschied ergab sich bei der Anfangsfiltration (Filtr.₁₀). Diese war bei Kontrollversuchen um 20% größer als bei i. v.-Versuchen. Bei Filtr.₃₅ ergaben die Messungen für die Kontrollversuche eine um 9% höhere Filtrationsmenge/min als für die i. v.-Versuche. Auch die Gesamtfiltration (in ml) während der 45minütigen Blutperfusion war bei Kontrollversuchen größer. Die Filtrationsmenge übertraf mit 8,3 ml die der i. v.-Versuche (7,5 ml) um 9,3%. Es bestand keine Signifikanz.

- Orale Versuche. (Tab. 3, 4) Die orale Applikation der Pharmaka hatte auf die Phasen der Ödementwicklung nur geringen Einfluß. Unterschiede zu Kontrollversuchen waren nicht signifikant. Lediglich im Punkt akutes Ödem waren nach oraler Gabe 14% weniger Flüssigkeit zu registrieren als bei Kontrollversuchen. Das akute Ödem betrug dabei 10,4 ml statt 12,1 ml der Kontrollen.

Tab.: 4 Dynamik der Ödementstehung
i. v.-Versuche (n = 54)
Oral-Versuche (n = 40)

		i. v.	oral	Diff.	p
akut. Öd.	ml	6,7	10,4	35%	0,002
Filtr. ₁₀	ml/min	0,12	0,16	25%	0,07
Filtr. ₃₅	ml/min	0,19	0,21	6%	n. s.
Ges.filtr. 45 min	ml	7,5	8,9	15%	n. s.

Einfluß der Applikationsform. (Abb. 7, 8; Tab. 4) Wir stellten die Gruppe der intravenösen Versuche den oralen Versuchen gegenüber, um zu sehen, ob die Applikationsform die Pharmakonwirkung beeinflusst. Wieder ist zu beachten, daß die Gesamtzahl der oralen Versuche mit TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin zu diesem Vergleich herangezogen wurde. Schlußfolgerungen daraus sind also unter diesem Aspekt zu sehen.

Nach oraler Applikation der Pharmaka war das akute Ödem um durchschnittlich 35% stärker ausgebildet als nach intravenöser. Bei oralen Versuchen wurden als akutes Ödem 10,4 ml gemessen, bei i. v.-Versuchen 6,7 ml. Diese Differenz war mit $p = 0,002$ signifikant. Ein weiterer, grenzwertig signifikanter Unterschied ($p = 0,07$) war bei der Filtrationsmenge/min zu sehen. Wurden die Pharmaka oral gegeben, mußte eine um 25% größere Filtration registriert werden als nach intravenöser Gabe. Kaum jedoch differierten sie bei Filtration₃₅. Ebenfalls nicht signifikant unterschieden sich die orale und die intravenöse Versuchsgruppe, wenn das in 45 min filtrierte Volumen betrachtet wurde. Mit 8,9 ml war die Gesamtfiltration bei Oralversuchen um 15% größer als bei i. v.-Versuchen mit 7,5 ml.

Zusammenfassung

Allgemein schien das akute Ödem mit dem Ausmaß des gesamten Ödems in Haut- und Muskelgewebe in einem entscheidenden Zusammenhang zu stehen.

Nach intravenöser Pharmakongabe war die Ausbildung des akuten Ödems signifikant eingeschränkt. Auch die Anfangsfiltration ($Filtration_{10}$) war um 20% geringer als bei Kontrollversuchen. Die orale Gabe der Pharmaka hatte nur einen geringen Einfluß auf die Stadien der Ödemgenese. Das akute Ödem konnte um 14% reduziert werden.

Beim Vergleich der intravenösen und der oralen Applikationsform wurde deutlich, daß die Pharmaka nach intravenöser Gabe besonders das akute Ödem und die $Filtration_{10}$ wirkungsvoller beeinflussen.

3.3 Verumversuche, intravenöse Anwendung

Bei intravenösen Versuchen wurden die Pharmaka einmalig 45 Minuten vor der Endothelschädigung mit Etacrynsäure gegeben. Die Versuche galten in erster Linie dem Ziel, die Ödembildung durch die Etacrynsäure abzuschwächen oder aufzuheben. Daneben wurden Einflüsse auf Kreislaufparameter und mögliche vasoaktive Effekte der Pharmaka untersucht.

Die im Text (und in den Tabellen) aufgeführten Werte für den Proteingehalt und den Flüssigkeitsgehalt des Ödems in mg bzw. ml sind immer auf 1 g Trockengewicht bezogen. Angaben über eine prozentuale Hemmung des Ödems haben die jeweils zugehörigen Kontrollwerte, die in den Tabellen angeführt sind, als Bezugswert.

Bei Dosisangaben der Pharmaka gelten mg/kg Körpergewicht als Einheit.

3.3.1 TMHC, 10, 20 und 50 mg/kg (Abb. 9, 16; Tab. 5)

TMHC konnte die Ausbildung des Etacrynsäureödems deutlich vermindern. Bei einer Dosis von 10 mg/kg sank der Proteingehalt des Ödems im Muskel um 50% auf 5,20 mg. Dieser Effekt war mit $p < 0,001$ signifikant. Eine auf 20 mg/kg gesteigerte Dosis ließ einen Anstieg der ödemprotektiven TMHC-Wirkung erkennen: Es gelang eine Hemmung des Proteinödems um 73%, wobei die Ergebnisse mit $p > 0,001$ ebenfalls signifikant waren.

Mit 50 mg/kg ließ sich der Proteingehalt des Muskelödems um 43% hemmen.

In der Haut war die ödenhemmende Wirkung des TMHC weniger deutlich. Bei der niedrigen Dosis von 10 mg/kg lagen die Werte für den Proteingehalt in der Verumgruppe über denen der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Mit 20 mg/kg und mit 50 mg/kg ließen sich deutlichere Effekte erzielen. Der Proteingehalt im Ödem war um 44% bzw. 56% vermindert, allerdings lag hier keine Signifikanz vor.

Der Flüssigkeitsgehalt des Ödems wurde sowohl im Muskel- wie im Hautgewebe weniger stark beeinflusst als der Proteingehalt. So lag der Flüssigkeitsgehalt im Muskelödem nach 10 mg TMHC/kg bei 0,57 ml. Das Ödem war um 25% (nicht signifikant) gemindert. Signifikant ($p < 0,01$) war es nach der höheren Dosis (20 mg/kg) vermindert.

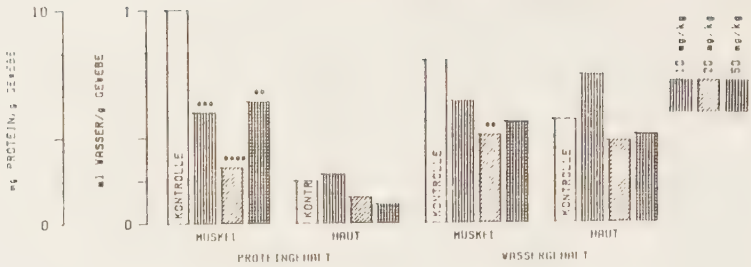


Abb.: 9 Ödemprotektiver Effekt von TMHC bei i. v. Applikation

TMHC konnte vor allem im Muskel die Ausbildung des Etacrynsäureödems signifikant verhindern.

Der Proteinanteil des Ödems war in Muskel und Haut deutlicher vermindert als der Flüssigkeitsanteil.

Bei 20 mg TMHC/kg war ein Wirkungsmaximum angedeutet.

Ein weiteres Erhöhen der Dosis auf 50 mg/kg konnte diesen Effekt nicht übertreffen: Man erhielt eine Ödenhemmung um 39%, die nicht signifikant war.

In der Haut ließ sich kein signifikanter Einfluß von TMHC auf den Flüssigkeitsgehalt des Ödems verzeichnen. Bei 10 mg/kg lagen die Werte um 30% über denen der Kontrollgruppe. Die beiden anderen Dosisgruppen erzielten Ödenhemmungen um 21% u. 13%.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung. Mit TMHC ließ sich in Muskel- und Hautgewebe der Proteinaustritt wesentlich stärker hemmen als der Flüssigkeitsaustritt. Wie Abb. 9 u. 16 zeigen, war der Einfluß von TMHC auf das Etacrynsäureödem dosisabhängig. Das Proteinödem im Muskel war nach 20 mg/kg signifikant ($p < 0,05$) geringer als nach 10 mg TMHC/kg.

Wider Erwarten setzte sich dieser Trend bei weiter erhöhter Dosis nicht fort: Nach 50 mg/kg war das Ödem signifikant weniger gehemmt als nach 20 mg/kg ($p < 0,01$).

An der Haut war die Tendenz einer gesteigerten Wirkung bei steigender Dosierung von TMHC zu erkennen. Da die Hemmung des Proteinaustritts nicht signifikant war, ist eine präzisere Dosis-Wirkungs-Zuordnung nicht möglich.

Der Flüssigkeitsgehalt des Ödems war in Muskulatur und Haut ebenfalls dosisabhängig verringert. Wieder fällt auf, daß 20 mg TMHC/kg einen maximalen Effekt hatten, der mit 50 mg/kg nicht mehr erreicht werden konnte.

- Zusammenfassung. TMHC i. v. führte in Muskel- und Hautgewebe zu einer signifikanten Hemmung des Etacrynsäureödems. Dabei waren sowohl Proteingehalt als auch Flüssigkeitsgehalt des Ödems im Muskel deutlicher vermindert als in der Haut. Die ödenhemmende Wirkung von TMHC war an Muskelgefäßen jeweils nahezu doppelt so stark wie an Hautgefäßen.

Wurde das Ödem nach seinem Protein- und Flüssigkeitsgehalt beurteilt, so war durch TMHC der Proteingehalt stärker (maximal um 70% am Muskel, um 50% an der Haut) als der Flüssigkeitsgehalt (um maximal 46% am Muskel, um 20% an der Haut) zu hemmen.

Der Einfluß von TMHC auf die Entwicklung des Etacrynsäureödems war signifikant dosisabhängig. Es war ein Wirkungsmaximum bei einer Dosis von 20 mg/kg zu registrieren.

- Kreislaufwirkung

Blutdruck. (Abb. 10; Tab. 6) Wenn man TMHC in einer 2%igen Lösung als Bolus injizierte, konnte man unmittelbar ein Absinken des arteriellen Mitteldruckes beobachten. Diese Wirkung hielt 1 - 2 Minuten lang an. Nach 5 - 10 Minuten war der Ausgangswert wieder erreicht. Aus Abb. 10 ist ersichtlich, daß der blutdrucksenkende Effekt des TMHC dosisabhängig war. Je nach Dosis sank der arterielle Druck um 21% (n. s.) bis 30% ($p < 0,001$).

Peripherer Widerstand. (Abb. 11; Tab. 8) Eine Änderung des präkapillären Widerstandes, die sich in einer Änderung des Perfusionsdruckes hätte

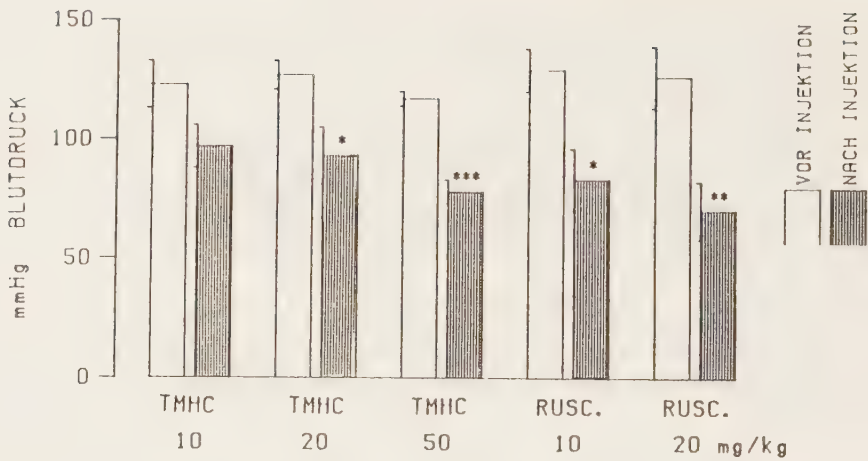


Abb.: 10 Wirkung von TMHC und Ruscus-Extrakt auf den Blutdruck

Nach i. v.-Injektion von TMHC oder Ruscus-Extrakt fiel der Blutdruck vorübergehend ab. Dieser Effekt setzte unmittelbar nach der Injektion ein und klang innerhalb weniger Minuten wieder ab.

Dargestellt sind die Mittelwerte des Blutdrucks (mit Standardabweichungen) jeweils vor und nach Injektion der Pharmaka. Dosis in mg/kg unter dem zugehörigen Säulenpaar.

äußern müssen, wurde während und nach i. v.-Gabe von TMHC nicht beobachtet.

Anders verhielt es sich bei dem Anstieg des Perfusionsdruckes, der durch den wachsenden interstitiellen Druck während der Ödementstehung verursacht war. Bei Kontrollen stieg der Perfusionsdruck während der 45minütigen Perfusion des Beines um 100,6% an.

10 mg TMHC/kg vermochten diesen Anstieg nicht zu verhindern. Nach

20 mg TMHC/kg jedoch stieg der Perfusionsdruck nur um 38,0%

($-20,1\%$) an ($p < 0,05$). 50 mg TMHC/kg bewirkten zwar ebenfalls eine

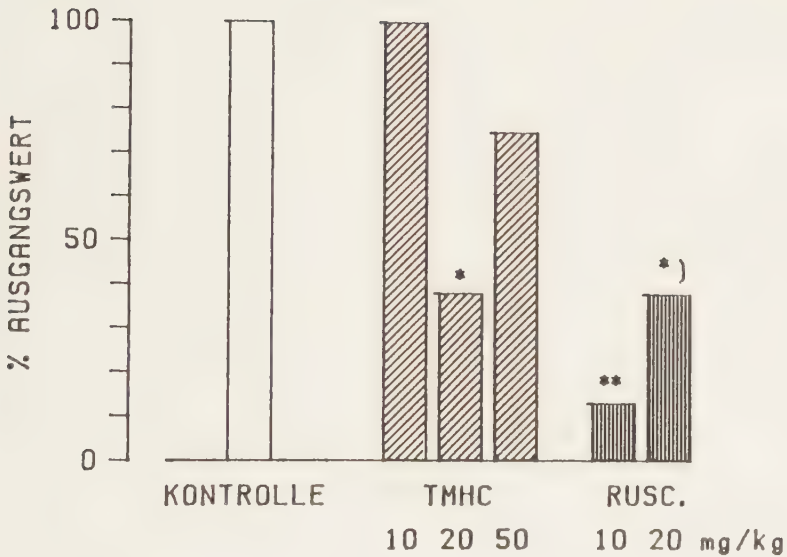


Abb.: 11 Anstieg des Perfusionsdruckes während 45minütiger Bein-perfusion im Anschluß an Schädigungsphase

Bei Kontrollen stieg der Perfusionsdruck während dieser Zeit um 101%, bezogen auf den Ausgangswert vor Beginn der Bein-perfusion, an. Durch die intravenöse Applikation der Substanzen TMHC und Ruscus-Extrakt war dieser Anstieg zum Teil signifikant geringer ausgeprägt, was auf einen günstigen Einfluß dieser Pharmaka auf den peripheren Widerstand schließen läßt.

*) : $p < 0,07$

geringere Steigerung des Perfusionsdruckes; mit 75,5% ($\pm 30,4\%$) aber unterschied sich dieser Anstieg nicht signifikant von den Kontrollen.

Somit äußerte sich die günstige Beeinflussung des Protein- und Flüssigkeitsödems nach 20 mg TMHC/kg auch in einem verminderten peripheren Widerstand.

Tab.: 5 Hemmung des Etacrynsäureödems durch TMIC und
Ruscus-Extrakt, intravenös

		TMIC n = 6	n = 5	Ruscus n = 5	n = 5	Kontrolle n = 16
Dosierung						
mg/kg	10	20	50	10	20	
Muskel	***	****	**	**	***	
mg Öd.prot./g	5,20	2,63	5,71	5,51	3,63	10,01
Trock.gew.	(⁺ 0,67)	(⁺ 0,64)	(⁺ 0,55)	(⁺ 0,55)	(⁺ 0,16)	(⁺ 0,41)
Prozentuale Ödenhemmung	48%	73%	43%	45%	63%	
Haut				**	**	
mg Öd.prot./g	2,30	1,21	0,88	0,33	0,22	1,99
Trock.gew.	(⁺ 0,92)	(⁺ 0,58)	(⁺ 1,15)	(⁺ 0,17)	(⁺ 0,30)	(⁺ 0,33)
Prozentuale Ödenhemmung	-13%	44%	56%	83%	89%	
Muskel		**		*	*	
ml Öd.flüss./g	0,57	0,41	0,47	0,45	0,41	0,76
Trock.gew.	(⁺ 0,12)	(⁺ 0,09)	(⁺ 0,14)	(⁺ 0,06)	(⁺ 0,09)	(⁺ 0,07)
Prozentuale Ödenhemmung	25%	46%	39%	41%	46%	
Haut						
ml Öd.flüss./g	0,69	0,38	0,41	0,39	0,32	0,48
Trock.gew.	(⁺ 0,12)	(⁺ 0,09)	(⁺ 0,17)	(⁺ 0,11)	(⁺ 0,12)	(⁺ 0,04)
Prozentuale Ödenhemmung	-30%	21%	13%	19%	34%	

- negative Werte unter "prozentuale Ödenhemmung" bedeuten, daß der Ödem-
gehalt mit Pharmakon höher liegt als ohne Pharmakon (= Kontrolle)

- S_E-Werte in Klammern

Tab.: 6 Blutdrucksenkung durch TMIC und Ruscus-Extrakt, intravenös
Blutdruckwerte vor und nach Pharmakongabe

TMIC mg/kg	art. Mitteldruck vor mmHg	art. Mitteldruck nach mmHg	Differenz
10	123,5 ($\pm 10,2$)	97,2 ($\pm 9,2$)	21,15%
20	126,8 ($\pm 5,7$)	93,0 ($\pm 12,2$)	26,6% *
50	117,5 ($\pm 3,4$)	78,0 ($\pm 4,8$)	32,7% ***
Ruscus			
mg/kg			
10	129,4 ($\pm 9,4$)	83,0 ($\pm 13,1$)	38,8% *
20	126,4 ($\pm 12,7$)	70,0 ($\pm 11,9$)	45,2% ***

Venentonus. Während und auch bis 10 min nach i. v.-Injektion von TMIC in den obigen Dosierungen konnte keine Änderung des Venentonus registriert werden. Eine Änderung des Venentonus hätte als direkte Folge eine Zu- oder Abnahme des Volumens der kapazitiven Beingefäße gehabt, was sich in einer Änderung des gemessenen venösen Rückflusses aus dem Bein gezeigt hätte. Der venöse Fluß blieb konstant. Das Venenvolumen war vor und nach i. v.-Gabe von TMIC gleich groß.

3.3.2 Ruscus-aculeatus-Extrakt, 10 und 20 mg/kg

(Abb. 12, 16; Tab. 5)

Der Extrakt aus *Ruscus aculeatus*, im folgenden auch *Ruscus* genannt, hemmte nach intravenöser Anwendung das Etacrynsäureödem dosisabhängig. Nach 10 mg/kg war der Proteingehalt im Muskelödem um 45% geringer als bei Kontrollen. Dieser Effekt war signifikant ($p < 0,01$). Nach verdoppelter Dosis war das Ödem um 63% gehemmt ($p < 0,0001$).

In der Haut wirkte *Ruscus* besonders gut ödemprotektiv. 10 mg *Ruscus*/kg verminderten den Gehalt an Ödemprotein um 83%. nach 20 mg/kg war das Ödem um 89% geringer. Der Proteingehalt betrug nur 0,22 mg/g, während bei den Kontrollen 1,99 mg/g zu messen waren ($p < 0,01$). Auffällig war, daß die Entstehung des eiweißreichen Ödems im Hautgewebe um nahezu 30% stärker zu hemmen war als im Muskelgewebe. Auch der Flüssigkeitsgehalt des Ödems war nach Gabe von *Ruscus* deutlich geringer, im Muskel nach 10 mg/kg um 41% und nach 20 mg/kg um 46%. Diese ödemprotektiven Effekte waren signifikant ($p < 0,05$).

In der Haut war das Flüssigkeitsödem durch *Ruscus* um 19% bzw. 34% zu vermindern. Allerdings waren die Ergebnisse dieser Dosierungen nicht signifikant. Die bevorzugte Wirkung von *Ruscus* in der Haut, wie sie für den Proteingehalt des Ödems beschrieben wurde, traf nicht für den Flüssigkeitsgehalt zu.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abb. 16)

Wurde die *Ruscus*dosis von 10 auf 20 mg/kg erhöht, führte dies im Muskelgewebe zu einer signifikant stärkeren Wirkung ($p < 0,01$). Der Proteinaustritt ließ sich so um annähernd 20% mehr hemmen. Im Hautgewebe war die Ödemhemmung schon in der niedrigen Dosis prozentual sehr hoch (83%). Trotzdem war mit 20 mg/kg noch eine leichte Steigerung auf 89% möglich.

- Zusammenfassung. Mit dem Extrakt aus *Ruscus aculeatus* ließ sich die ödematöse Wirkung der Etacrynsäure maximal um 89% (Eiweißgehalt) reduzieren. Der Flüssigkeitsgehalt war um maximal 45% zu verringern. Die ödemprotektive Wirkung war in der Haut ausgeprägter als im Muskel.

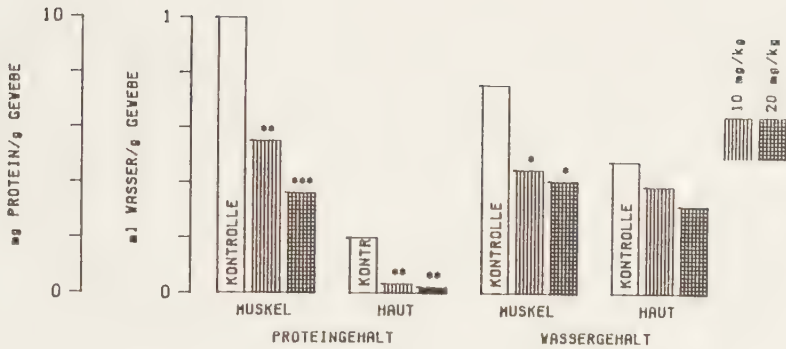


Abb.: 12 Ödemprotektive Wirkung von Ruscus bei i. v.-Applikation

Im Vergleich zu TMIC war das eiweißreiche Ödem an der Haut erheblich stärker vermindert. Daneben war auch im Muskel das Ödem signifikant zu hemmen.

Fallzahlen und Standarderror siehe Tab. 5.

- Kreislaufwirkung

Blutdruck. (Abb. 10; Tab. 6) Ruscus i. v. senkte vorübergehend den Blutdruck. Der Effekt setzte bereits während der Injektion ein, erreichte nach 1 - 2 Minuten sein Maximum und war nach 10 Minuten wieder völlig abgeklungen. Die Wirkung war dosisabhängig. Nach 10 mg Ruscus/kg sanken die Mittelwerte um nahezu 40% von 129 mmHg auf 83 mmHg ab. Bei verdoppelter Dosis war die Abnahme des Blutdrucks (um 45%) noch ausgeprägter. Beide Ergebnisse waren signifikant ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

Peripherer Widerstand. (Abb. 11; Tab. 8) Der periphere Widerstand änderte sich weder während noch nach i. v.-Injektion von Ruscus.

Ein Einfluß auf den peripheren Widerstand zeigte sich erst während der 45minütigen Perfusion. Die langsame Steigerung des Perfusionsdruckes war durch 10 mg Ruscus/kg signifikant ($p = 0,017$) um 87% zu vermindern. Auch nach 20 mg/kg war der Druckanstieg signifikant ($p = 0,05$) um 62% geringer. Dies bedeutet, daß Ruscus i. v. den Anstieg des peripheren Widerstandes als Begleitumstand des interstitiellen Ödems signifikant mindern konnte.

Venentonus. Das Venenvolumen blieb bei i. v.-Gabe von Ruscus-Extrakt unverändert. Nach Injektion der Ruscusdosis war das intravasale Volumen um durchschnittlich 0,25% ($\pm 4\%$) größer als vor der Injektion ($n = 5$). Diese Änderung war minimal und lag im Rahmen der Abweichungen, wie sie auch bei Kontrollversuchen aufgetreten waren.

- Zusammenfassung. Im Vergleich von TMIC und Ruscus i. v. am Muskel war die Hemmung des Proteinaustritts nach TMIC und Ruscus in vergleichbaren Dosen in etwa gleich stark ausgeprägt. An der Haut wurde das eiweißreiche Ödem durch Ruscus erheblich stärker vermindert: TMIC hatte in einer Dosierung von 10 mg/kg keinen ödemprotektiven Einfluß, bei 20 mg/kg einen hemmenden Effekt auf die Proteinpermeabilität von 44%. Ruscus dagegen hemmte diese bereits in der Dosis von 10 mg/kg um 83%, bei 20 mg/kg gar um 89%. Hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Flüssigkeitsgehalt des Ödems in Muskel- und Hautgewebe unterschieden sich TMIC und Ruscus nur geringfügig.

Sowohl TMIC als auch Ruscus konnte den Anstieg des peripheren Widerstandes während der 45minütigen Perfusion signifikant reduzieren.

3.3.3 Ruscogenin, 4 mg/kg (Tab. 7)

Ruscogenin ist als genines Saponin im Ruscus-Extrakt enthalten. Sein Anteil an der Gesamtfraktion der Steroidsaponine betrug etwa 11 bis 12% (Mitteilung über Phlebodril^R der Fa. Lipha). In der Annahme, daß Ruscogenin der wesentliche Wirkstoff des Extraktes sei (Seidenberger et al. 1974), wurde es in einer dem Steroidanteil des Gesamtextraktes äquivalenten Menge dosiert. Der uns vorliegende

Tab.: 7 Hemmung des Etacrynsäureödems durch Ruscogenin, intravenös

Dosis 4 mg/kg

	Kontrolle	Ruscogenin	Prozentuale Hemmung
	n = 16	n = 5	
Muskel		***	
mg Öd.prot./g	10,01	4,72	53%
Trockengew.	($\pm 0,41$)	($\pm 1,27$)	(± 27)
Haut			
mg Öd.prot./g	1,99	0,59	70%
Trockengew.	($\pm 0,33$)	($\pm 0,47$)	(± 79)
Muskel			
ml Öd.flüss./g	0,76	0,49	35%
Trockengew.	($\pm 0,07$)	($\pm 0,02$)	(± 4)
Haut			
ml Öd.flüss./g	0,48	0,41	15%
Trockengew.	($\pm 0,04$)	($\pm 0,12$)	(± 29)

Ruscus-Extrakt war auf 22% Steroidanteil standardisiert worden (Fa. Lipha).

Somit entsprechen 4 mg Ruscogenin mengenmäßig in etwa den Steroiden von 20 mg Ruscus-Extrakt.

Ruscogenin wurde 2%ig in PÄG gelöst. Nach 4 mg/kg war der Proteinanteil des Etacrynsäureödems im Muskel um 53% signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt. Im Hautgewebe war er um 70% verringert. Es wurden hier 0,59 mg Protein/g gemessen. In der Signifikanz allerdings lag dieser Wert über dem 5%-Niveau. Der Flüssigkeitsgehalt des Ödems war weniger gut zu beeinflussen. Im Muskel war eine 35%ige und in der Haut eine 15%ige Abnahme der Ödemflüssigkeit im Vergleich zu den Kontrollen zu erzielen. So war weder im Muskel- noch im Hautgewebe die Entstehung des flüssigkeitsreichen Ödems signifikant zu verhindern. Vergleich man die Wirkung des Ruscogenins auf Muskel und Haut, so

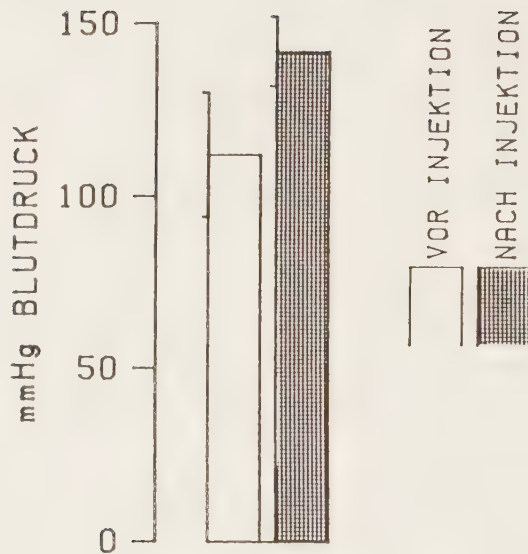


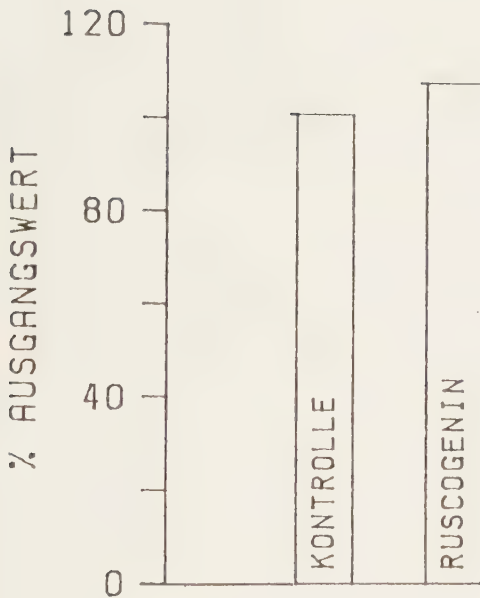
Abb.: 13 Beeinflussung des Blutdrucks nach intravenöser Injektion von Ruscogenin (4 mg/kg)

Im Gegensatz zu den anderen in gleicher Weise applizierten Substanzen TMHC und Ruscus-Extrakt trat nach Injektion von Ruscogenin ein Anstieg des Blutdrucks ein. Nach Injektion lagen die Meßwerte kurzfristig um 21% höher als die Ausgangswerte, jedoch war diese Differenz nicht signifikant.

war das eiweißreiche Ödem in der Haut deutlicher vermindert (um 70%) als im Muskel (um 53%). Die Ödemflüssigkeit hingegen war im Muskelgewebe geringer.

- Zusammenfassung. Durch Ruscogenin ließ sich die endothelschädigende Wirkung der Etacrynsäure in Muskel und Haut bis zu maximal 70% hemmen. Der Effekt war in der Haut stärker als im Muskel.

Abb.: 14 Einfluß von
Ruscogenin i.v. auf
den Perfusionsdruck
(4 mg/kg)



Nach intravenöser Gabe von Ruscogenin war kein Einfluß auf den Perfusionsdruck während der Beinperfusion zu erkennen.

- Kreislaufwirkung

Blutdruck. (Abb. 13) Ruscogenin änderte den arteriellen Mitteldruck bei Injektion von 4 mg/kg i. v. nicht signifikant. Die Werte lagen nach Applikation kurzfristig um 21% höher. Dieser Anstieg war auch bei Kontrollversuchen mit Injektion von PÄG zu beobachten, sowie nach Bolusinjektion anderer volumenwirksamer Flüssigkeiten (z. B. Blut, Makrodex).

Peripherer Widerstand. (Abb. 14; Tab. 8) Nach i. v.-Injektion von Ruscogenin war keine unmittelbare Änderung des präkapillären Widerstandes zu registrieren. Die bei Kontrollversuchen zu beobachtende Steigerung des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Perfusion trat auch nach Ruscogenin i. v. auf.

Tab.: 8 Anstieg des arteriellen Perfusionsdruckes während
Blutperfusion
TMHC, Ruscus, Ruscogenin, i. v.

	Kontrolle		TMHC		Ruscus		Ruscogenin
	n = 16	n = 6	n = 6	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Dosis in mg/kg		10	20	50	10	20	4
P _{Perf}	+100,6% ($\pm 19,9$)	+103,1% ($\pm 64,1$)	+38,0% ($\pm 20,1$)	+72,5% ($\pm 30,4$)	+13,0% ($\pm 14,1$)	+38,0% ($\pm 15,5$)	+108,0% ($\pm 71,6$)
Signifikanz zu Kontrolle		n. s.	p<0,05	n. s.	p=0,01	p=0,05	n. s.

Venentonus. Während und bis zu 10 min nach i.v.-Injektion von Ruscogenin war keine Veränderung des Venentonus zu erkennen. Das kapazitive Volumen des Beinvenensystems änderte sich nicht wesentlich. Das Venenvolumen vor Ruscogeningabe betrug 2,35 ($\pm 0,12$) ml, nach i.v.-Gabe 2,46 ($\pm 0,18$) ml. Die Zunahme des Venenvolumens von 4,4% war nicht signifikant.

- Vergleich Ruscus-Extrakt mit Ruscogenin

Im Ruscus betrug der Saponinanteil 22%. Davon entfielen 11 - 12% auf Ruscogenin (Fa. Lipha). Aus diesen Angaben ergibt sich, daß der Ruscogeninanteil des Ruscus etwa 2% betrug. Aus der Gegenüberstellung von Ruscus und Ruscogenin (Tab. 5 u. 7) lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Ruscogenin hatte an Haut- und Muskelgewebe wie Ruscus ödenhemmende Wirkung.
2. Die Forderung: "Ruscogenin ist der Hauptwirkungsträger des Ruscus-Extraktes" ließ sich nicht bestätigen.
Der angewandten Dosierung von 20 mg Ruscus/kg hätte eine Ruscogenindosis von 0,4 mg/kg entsprochen, vorausgesetzt der Ruscogeninanteil am Extrakt betrug etwa 2%. Benötigt wurde aber die 10-fache Menge Ruscogenin, also eine Dosierung von 4 mg/kg, die der Gesamtmenge der Steroide des Extraktes entsprach, um an Haut und Muskel eine dem Ruscus vergleichbare Wirkung zu erzielen.
3. An Muskel- und Hautgefäßen galten für Ruscus wie für Ruscogenin unterschiedliche Wirkungsprävalenzen:
 - Ruscogenin wirkte wie Ruscus an der Haut stärker proteinhemmend als am Muskel
 - Die Flüssigkeitshemmung von Ruscogenin und von Ruscus war jeweils am Muskel stärker ausgeprägt.
 - Beide, Ruscogenin und Ruscus wirkten an den Gefäßwänden stärker proteinhemmend als flüssigkeitshemmend.
4. Der blutdrucksenkende Effekt des Ruscus wurde bei Ruscogenin nicht beobachtet.
5. Der signifikante Einfluß von Ruscus auf den peripheren Widerstand während der 45minütigen Perfusion war bei Ruscogenin nicht aufgetreten.

3.4 Verumversuche, intravenös

Kombinierte Anwendung von TMHC und Ruscus-Extrakt (Abb. 15, 16; Tab. 9)

Angesichts einiger im Handel befindlicher Medikamente, die die beiden von uns zunächst einzeln untersuchten Stoffe TMHC und Ruscus kombiniert enthalten, wurden TMHC und Ruscus in folgenden Dosierungen verabreicht:

1. 10 mg TMHC/kg und 10 mg Ruscus/kg (10/10-Kombination)
2. 10 mg TMHC/kg und 20 mg Ruscus/kg (10/20-Kombination)
3. 20 mg TMHC/kg und 20 mg Ruscus/kg (20/20-Kombination)

Alle Dosisangaben beziehen sich auf 1 kg Körpergewicht.

Wie bei den Einzelsubstanzen wurde auch mit den Kombinationen vor allem die Hemmung des Etacrynsäureödems und weiterhin die Kreislaufwirkung untersucht. Insbesondere interessierte, ob die Komponenten einander additiv oder überadditiv verstärkten.

Die gleichzeitige Verabreichung von 10 mg TMHC/kg und 10 mg Ruscus/kg schränkte die Ausbildung des Etacrynsäureödems im Muskelgewebe um 55% ein. Der Proteingehalt des Ödems war mit 4,54 mg signifikant ($p < 0,001$) niedriger als in der Kontrollgruppe. Abbildung 16 zeigt, daß diese Kombination den Effekt der Einzelsubstanzen TMHC und Ruscus bei 10 mg/kg übertreffen konnte. Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

Ein anderes Bild bot sich bei der 10/20-Kombination von TMHC und Ruscus. Im Muskelödem war der Proteinaustritt um 54% zu hemmen. Hier bestand eine Differenz zwischen der erwarteten Hemmung des Ödems anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven von TMHC und Ruscus und dem tatsächlichen Effekt der Kombination.

Die 20/20-Kombination wirkte mit $p = 0,02$ signifikant stärker als die 10/20-Kombination: Bei 2,07 mg Ödemprotein/g Muskelgewebe lag eine 80%ige Hemmung des Etacrynsäureödems vor. Diese Kombination übertraf die Wirkung von TMHC und Ruscus bei 20 mg/kg, so daß ein additiver Effekt resultierte.

An der Haut bestätigte sich die Wirkung des Ruscus-Extraktes auch in Kombination mit TMHC. Die 10/10-Kombination reduzierte den Proteinaustritt im Hautödem um 90%. Diese signifikante Hemmung ($p < 0,01$) wurde mit erhöhter Ruscus-Dosis (10/20-Kombination) noch weit übertroffen: Der Gehalt an extravasalem Plasmaprotein war in der Haut des perfundierten Beines, in dem die Etacrynsäure



Abb.: 15 Ödemprotektiver Effekt von TMHC und Ruscus bei kombinierter Anwendung (i. v.)

Kombiniert wurden 10 mg TMHC und 10 mg Ruscus/kg, 10 mg TMHC und 20 mg Ruscus/kg, 20 mg TMHC und 20 mg Ruscus/kg. Neben der ödemhemmenden Wirkung im Muskel ist wie bei Ruscus i. v. der besonders günstige Effekt in der Haut hervorzuheben.

Fallzahlen und Standarderror siehe Tab. 9.

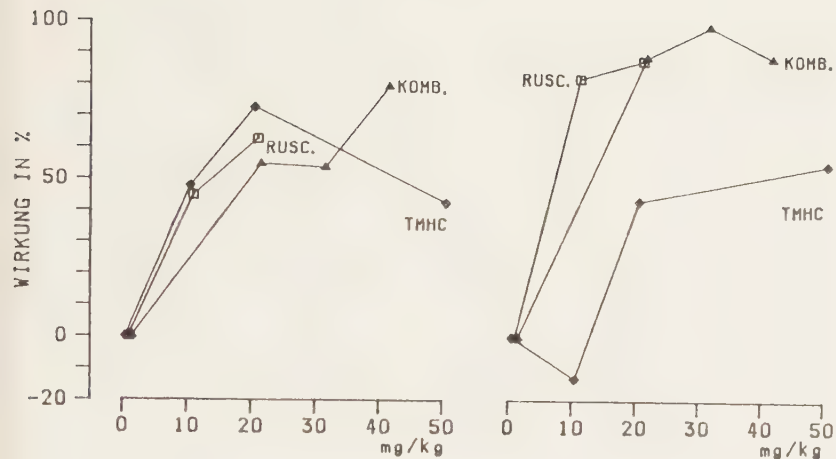
appliziert worden war, sogar geringer als in der des Kontrollbeines. Es resultierte eine signifikante Hemmung ($p < 0,01$) um über 100%.

Die 20/20-Kombination zeitigte eine ebenfalls signifikante Abnahme des Proteinaustritts um 90% ($p < 0,05$). Sowohl die 10/10- als auch die 10/20-Kombinationen zeigten eine additive Verstärkung, wie aus Abb. 16 hervorgeht. Für TMHC ist diese Steigerung signifikant (p jeweils $< 0,01$).

Tab.: 9 Ödenhemmung durch TMIC und Ruscus-Extrakt
in Kombination, intravenös
Etacrynsäureödem

	n = 5	n = 5	n = 5	
	TMIC/Rusc.	TMIC/Rusc.	TMIC/Rusc.	Kontrolle
Dosierung				
mg/kg	10/10	10/20	20/20	
Muskel	***	**	***	
mg Öd.prot./g	4,54	4,66	2,07	10,01
Trock.gew.	($\pm 0,43$)	($\pm 0,87$)	($\pm 0,41$)	($\pm 0,41$)
Prozentuale Ödenhemmung	55%	54%	80%	
Haut	**	**	*	
mg Öd.prot./g	0,18	-0,09	0,18	1,99
Trock.gew.	($\pm 0,23$)	($\pm 0,08$)	($\pm 0,22$)	($\pm 0,33$)
Prozentuale Ödenhemmung	90%	104%	90%	
Muskel	*		**	
ml Öd.flüss./g	0,42	0,53	0,36	0,76
Trock.gew.	($\pm 0,10$)	($\pm 0,08$)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,07$)
Prozentuale Ödenhemmung	45%	30%	53%	
Haut		*		
ml Öd.flüss./g	0,40	0,25	0,33	0,48
Trock.gew.	($\pm 0,10$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,16$)	($\pm 0,04$)
Prozentuale Ödenhemmung	16%	48%	32%	

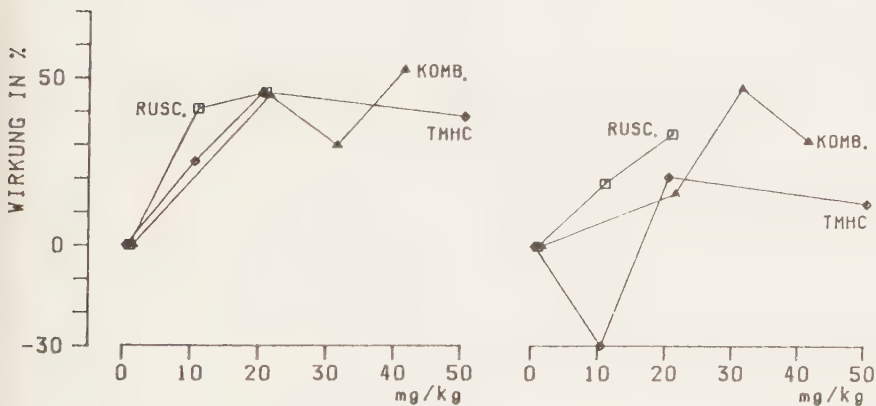
- S_E-Werte in Klammern



a.) Hemmung des Proteinödems

in Muskelgewebe

in Hautgewebe



b.) Hemmung des Flüssigkeitsödems

in Muskelgewebe

in Hautgewebe

Abb.: 16 Hemmung des Etacrynsäureödems im Katzenhinterlauf

Dosisabhängiger Verlauf der ödemprotektiven Wirkung von TMHC, Ruscus-Extrakt und Kombination dieser Substanzen nach intravenöser Applikation. Dargestellt ist die prozentuale Reduktion des Protein- und Flüssigkeitsgehaltes im Ödem des Muskel- und Hautgewebes. Die jeweiligen Kontrollen gelten als Bezugswerte, wobei eine Wirkung von 100% der völligen Hemmung des Etacrynsäureödems entspräche. Negative Werte bedeuten, daß das Ödem nach Pharmakongabe größer war als bei Kontrollen.

Fallzahlen und $S_{\bar{x}}$ siehe Tab. 5 u. 9.

Der Einfluß der Kombinationen auf die erhöhte Gefäßpermeabilität für Flüssigkeit war, wie bereits für TMHC und Ruscus als Einzelsubstanzen beschrieben, geringer ausgeprägt.

Im Muskel konnte die 10/10-Kombination die Entwicklung des Flüssigkeitsödems signifikant um 45% herabsetzen. Nach der 10/20-Kombination war keine gesteigerte Wirkung zu sehen. Mit 0,53 ml Ödenflüssigkeit war die 30%ige Ödemhemmung nicht signifikant und geringer als bei der 10/10-Kombination. Anders waren die Verhältnisse in der Gruppe der 20/20-Kombinationen: Sie verminderten den Flüssigkeitsaustritt im Muskelödem um 53% ($p < 0,01$).

Für die 10/10- sowie für die 20/20-Kombinationen kann wieder ein additiver Effekt der beiden Einzelsubstanzen geltend gemacht werden.

Wie bereits bei den Versuchen mit TMHC und Ruscus, war auch mit deren Kombinationen nur eine geringe Beeinflussung des Flüssigkeitsaustritts in der Haut zu erkennen. Einzig die 10/20-Kombination konnte das Flüssigkeitsödem um 48% signifikant hemmen ($p = 0,06$). TMHC und Ruscus zeigten dabei eine additive Wirkung.

Tab.: 10 Blutdrucksenkung durch TMHC und Ruscus-Extrakt
in Kombination, intravenös
Mittlerer arterieller Druck vor und nach Pharmakongabe

Kombination TMHC Ruscus mg/kg		art. Mitteldruck vor mmHg	art. Mitteldruck nach mmHg	Differenz
10	10	112,6 ($\pm 4,6$)	81,8 ($\pm 5,8$)	27% **
10	20	100,0 ($\pm 11,5$)	82,6 ($\pm 9,7$)	16,6%
20	20	114,4 ($\pm 16,3$)	69,8 ($\pm 13,9$)	40,8%

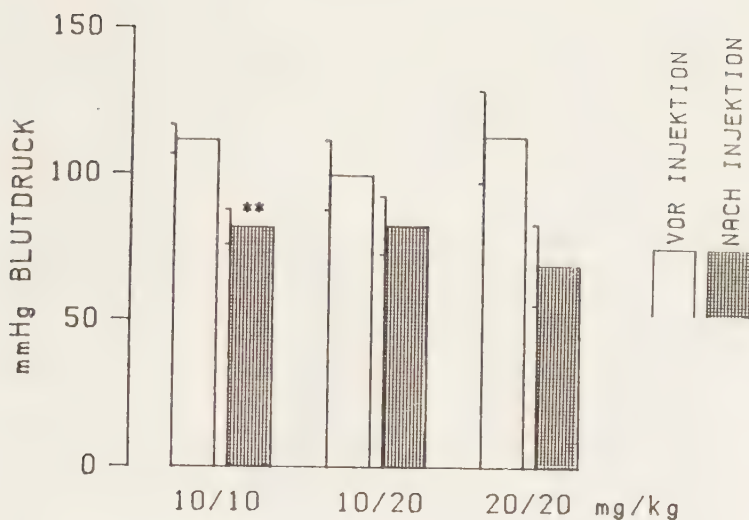


Abb.: 17 Wirkung von Kombinationen aus TMHC und Ruscus-Extrakt auf den Blutdruck bei intravenöser Injektion

Verwendet wurden Kombinationen aus 10 mg TMHC/kg und 10 mg Ruscus-Extrakt/kg, aus 10 mg TMHC/kg und 20 mg Ruscus-Extrakt/kg sowie aus 20 mg TMHC/kg und 20 mg Ruscus-Extrakt/kg.

Abgebildet sind die Mittelwerte des Blutdruckes (mit Standardabweichung) jeweils unmittelbar vor und nach intravenöser Injektion der Kombinationen.

- Zusammenfassung. TMHC und Ruscus wurden in 10/10, 10/20 und 20/20 mg/kg-Dosierungen kombiniert. Wie bei den Einzelsubstanzen war auch bei den Kombinationen die Ausbildung des Proteinödems deutlicher zu verhindern als die des Flüssigkeitsödems. An der Haut war die Wirkung der Kombinationen besonders ausgeprägt.

In 7 der 12 Dosisgruppen verstärkten sich die Effekte von TMHC und Ruscus additiv.

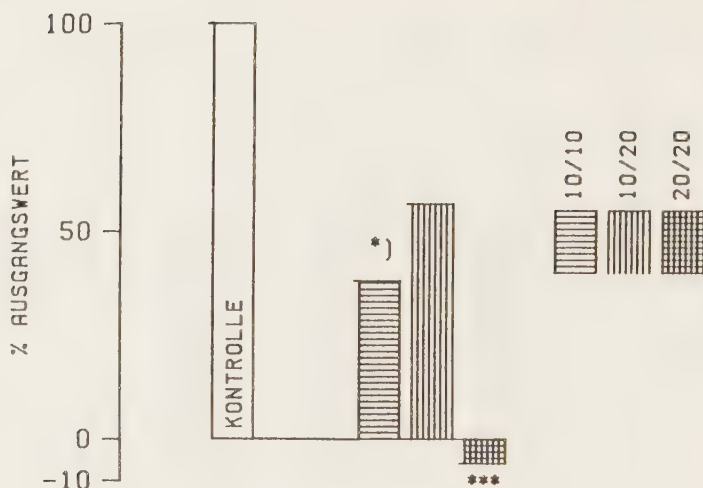


Abb.: 18 Einfluß von Kombinationen aus TMIC und Ruscus-Extrakt (intravenös) auf den Perfusionsdruck

Dargestellt ist der prozentuale Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Beinperfusion, im Anschluß an die Schädigungsphase, bezogen auf den Ausgangswert zu Beginn der Perfusion. Negative Werte für die Kombination aus 20 mg TMIC/kg und 20 mg Ruscus-Extrakt/kg bedeuten, daß hier der Perfusionsdruck im Verlauf der Beinperfusion nicht anstieg, sondern um 5,8% unter den Ausgangswert absank.

*) $p = 0,07$

- Kreislaufwirkung.

Blutdruck (Abb. 17; Tab. 10). Bei Injektion von TMIC/Ruscus-Kombinationen war ein akut einsetzender Blutdruckabfall zu beobachten. Dieser dauerte 1 - 2 Minuten an. Nach 8 - 10 Minuten war der Ausgangswert wieder erreicht.

Wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen, fiel der arterielle Mitteldruck je nach Dosis der Kombinationen um 17% bis 41%.

Im Vergleich zu Ruscus (Tab. 6) war der depressorische Effekt der Kombinationen durchwegs schwächer. Andererseits senkte TMHC den Blutdruck nicht so deutlich wie die Kombinationen.

Peripherer Widerstand (Abb. 18; Tab. 15). TMHC und Ruscus konnten auch in Kombination den Perfusionsdruck akut nicht beeinflussen. Der langsame Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Perfusion war je nach Kombination unterschiedlich. So stieg er nach 10/10-Kombinationen nur um 38% ($p < 0,07$), nach 10/20-Kombinationen nur um 56% (n. s.). Im Vergleich dazu stieg er bei Kontrollen um 100,6%. Am deutlichsten war der Effekt bei der 20/20 Kombination: Der Perfusionsdruck nahm signifikant ab ($p = 0,005$) und lag sogar um 6% unter dem Ausgangswert.

Venentonus. Nach i. v.-Injektion der Kombinationen aus TMHC und Ruscus änderte sich das intravasale Volumen nur geringgradig und nicht signifikant. Eine Abnahme des intravasalen Volumens hätte auf einen tonisierenden Effekt der kombinierten Wirkstoffe hingedeutet.

So sank das intravasale Volumen des perfundierten Beines nach Injektion von 10/10-Kombinationen um durchschnittlich 3,7% ($^{+2,1}$), nach 20/20-Kombinationen um 3,0% ($^{+2,1}$). 10/20-Kombinationen bewirkten eine Zunahme des Volumens um 8% ($^{+4,0}$).

3.5 Verumversuche, orale Anwendung

Die orale Applikation der Pharmaka erfolgte, wie beschrieben, über eine Schlundsonde. Zeitlich lag sie etwa 4 Stunden vor der mit Etacrynsäure durchgeführten Gefäßschädigung. Versuche über die enterale Resorption der angewandten Pharmaka ließen eine ungefähr 10%ige Resorptionsquote erwarten. Deshalb erhielten die Tiere oral die zehnfache Menge der jeweiligen i. v.-Dosis.

3.5.1 TMHC, 100 mg/kg und 200 mg/kg. (Abb. 19, 26; Tab. 11)

Durch 100 mg TMHC/kg war das Proteinödem im Muskelgewebe um 27% geringer als bei Kontrollen ($p = 0,01$). Bei doppelter Dosis war dieser Effekt auf 63% zu steigern. Der Gehalt an Ödemprotein war signifikant ($p < 0,001$) vermindert und betrug 3,60 mg/g.

An der Haut konnte man nach oraler TMHC-Gabe keinen hemmenden Einfluß auf die Gefäßpermeabilität für Proteine aufzeigen. Der Ödemproteingehalt war nach 100 mg TMHC/kg nur minimal niedriger als bei den Kontrollen. Nach 200 mg TMHC/kg übertrafen die Werte für Ödemprotein die zugehörigen Kontrollwerte um 30%, allerdings nicht signifikant.

Der Flüssigkeitsgehalt des Muskelödems lag nach 100 mg TMHC/kg etwa in der gleichen Höhe wie bei den zugehörigen Kontrollen. Nach erhöhter Dosis (200 mg/kg) war ein um 15% verstärktes Flüssigkeitsödem zu registrieren. In beiden Dosisgruppen konnte also die Ausbildung des Flüssigkeitsödems im Muskel nicht signifikant gehemmt werden.

Im Hautödem fand sich nach TMHC oral ebenfalls kein erniedrigter Flüssigkeitsgehalt. In der Gruppe mit 100 mg/kg lag der Flüssigkeitsgehalt bei 0,54 ml. Somit waren die Kontrollwerte um 12% übertroffen. 200 mg TMHC/kg verstärkten das Hautödem auf 0,97 ml Flüssigkeit. Diese Werte waren signifikant ($p < 0,01$) um 50% höher als die Kontrollwerte.

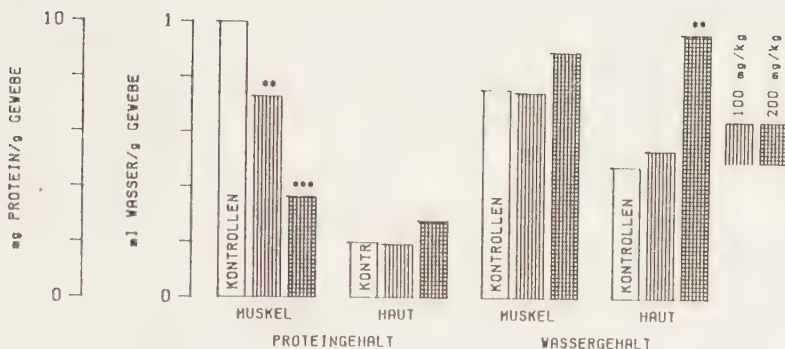


Abb.: 19 Ödemprotektiver Effekt von TMIC nach oraler Anwendung

Das Etacrynsäureödem war vor allem im Muskel zu hemmen, im wesentlichen der Proteiniübertritt. Die Wirkung auf den Flüssigkeitsübertritt war gering

Fallzahlen und Standarderror siehe Tab. 11.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung. (Abb. 26). Das Ödem im Muskelgewebe war nach erhöhter TMIC-Dosis signifikant ($p = 0,01$) stärker unterbunden. Bei Verdoppelung der Dosis von 100 mg/kg auf 200 mg/kg stieg die Hemmung des Proteingehaltes von 27% auf 63%. Im Hautgewebe war der ödemprotektive Effekt von TMIC bei erhöhter Dosis geringer, bzw. es trat eine ödematöse Wirkung auf.

Ein ähnliches Ergebnis erhielt man hinsichtlich des Flüssigkeitsgehaltes: Am Muskel erhöhte sich bei Dosisverdoppelung die Ödemflüssigkeit um 15%. Ebenfalls nicht ödemprotektiv war die Wirkung nach erhöhter TMIC-Dosis im Hautgewebe. Es ergab sich ein um 50% höherer Gehalt an Ödemflüssigkeit als bei den Kontrollwerten.

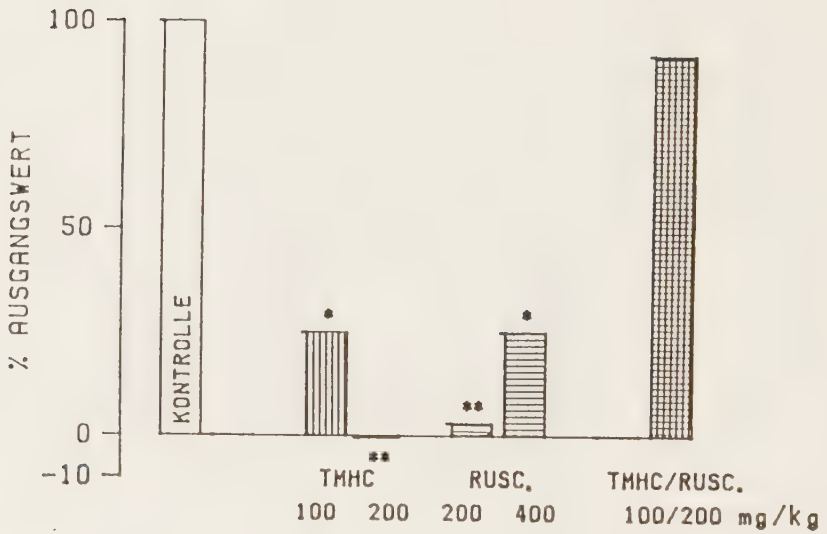


Abb.: 20 Einfluß von TMHC und Ruscus-Extrakt auf den Perfusionsdruck nach oraler Gabe

TMHC und Ruscus konnten den Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Perfusion signifikant hemmen. Eine Kombination aus 100 mg TMHC/kg und 200 mg Ruscus-Extrakt/kg zeigte diesen Effekt nicht.

Dargestellt ist der prozentuale Anstieg des Perfusionsdruckes, bezogen auf den Ausgangswert vor der 45minütigen Perfusion.

Dosis in mg/kg unter den jeweiligen Säulen.

Standardabweichungen siehe zugehörige Wertetabelle.

- Kreislaufwirkung

Blutdruck. Nach oraler TMHC-Medikation unterschied sich der arterielle Mitteldruck, jeweils zweimal vor sowie zweimal nach der Schädigungs-

phase gemessen, nicht signifikant von dem der Kontrolltiere ohne Pharmakongabe.

Peripherer Widerstand. (Abb. 20; Tab. 13) Obwohl TMIC bei oraler Dosierung nur mäßig ödemprotektiv wirkte, war trotzdem eine Reduzierung des arteriellen Perfusionsdruckes zu beobachten. Der Perfusionsdruck als Maß für den peripheren Widerstand stieg in der Gruppe der 100 mg-Dosierung nur um 25% während der 45minütigen Perfusion an. Er lag damit deutlich unter dem Anstieg der Kontrollversuche ($p = 0,05$). Die 200 mg-Gruppe konnte diese Aussage nur bestätigen. Sie zeigte einen Abfall des Perfusionsdruckes um 0,5%, $p = 0,01$. Dies sprach für eine Abnahme des peripheren Widerstandes nach oraler TMIC-Gabe.

Venentonus. Ein Einfluß von TMIC auf das intravasale Volumen des Beines war auch nach oraler Applikation nicht erkennbar.

- Zusammenfassung. TMIC zeigte in den angewandten Dosen oral nur im Muskelgewebe eine Hemmung der gesteigerten Proteinpermeabilität. In der Haut war kein ödemprotektiver Effekt zu sehen. Der Flüssigkeitsgehalt war in Muskel- und Hautgewebe gleichermaßen erhöht, in der Haut um 50%. Die orale Dosierung von TMIC führte aber zu einer signifikanten Abnahme des peripheren Widerstandes.

Tab.: 11 Hemmung des Etacrynsäureödems durch TMIC und
Ruscus-Extrakt, oral

	TMIC		Ruscus		Kontrolle
	n = 5	n = 5	n = 5	n = 6	
Dosierung					
mg/kg	100	200	200	400	
Muskel	***	***	***	***	
mg Öd.prot./g	7,30	3,65	7,45	5,28	10,01
Trock.gew.	($\pm 0,92$)	($\pm 0,36$)	($\pm 0,68$)	($\pm 1,04$)	($\pm 0,41$)
Prozentuale Ödemhemmung	27%	63%	25%	48%	
Haut					
mg Öd.prot./g	1,93	2,79	2,13	2,46	1,99
Trock.gew.	($\pm 0,81$)	($\pm 1,20$)	($\pm 0,86$)	($\pm 1,12$)	($\pm 0,33$)
Prozentuale Ödemhemmung	3%	-30%	-6%	-19%	
Muskel					
ml Öd.flüss./g	0,75	0,90	0,48	0,79	0,78
Trock.gew.	($\pm 0,20$)	($\pm 0,26$)	($\pm 0,23$)	($\pm 0,15$)	($\pm 0,07$)
Prozentuale Ödemhemmung	1%	-15%	36%	-4%	
Haut		***			
ml Öd.flüss./g	0,54	0,97	0,55	0,93	0,48
Trock.gew.	($\pm 0,13$)	($\pm 0,33$)	($\pm 0,07$)	($\pm 0,47$)	($\pm 0,04$)
Prozentuale Ödemhemmung	-12%	-50%	-12%	-48%	

- negative Werte unter "prozentuale Ödemhemmung" bedeuten in der Verumgruppe einen höheren Ödengehalt als in der Kontrollgruppe

- S_E-Werte in Klammern

3.5.2 Ruscus-aculeatus-Extrakt, 200 mg/kg und 400 mg/kg

(Abb. 21, 24; Tab. 11)

Wie im Falle der TMHC-Versuche gilt auch hier, daß Ruscus 4 Std. vor Gefäßschädigung oral verabreicht wurde.

Da auch für Ruscus eine Resorptionsquote von ungefähr 10% angegeben wird, wählten wir zunächst eine Dosis von 100 mg/kg, um Blutspiegel zu erreichen, die etwa im Bereich der intravenösen Dosen lagen.

Da sich keine signifikanten ödemprotektiven Effekte zeigten, wurden schließlich 200 und 400 mg/kg verabreicht.

Das durch Etacrynsäure erzeugte Muskelödem ließ sich signifikant beeinflussen. Der Proteingehalt des Ödems war nach Applikation von 200 mg Ruscus/kg um 25% auf 7,45 mg vermindert. Bei einer Dosis von 400 mg konnte eine ebenfalls signifikante ($p < 0,01$) Hemmung des Proteinaustritts um 48% erreicht werden.

An der Haut war in beiden Dosisgruppen keine Abnahme des Ödemproteins zu registrieren. Die erhaltenen Werte lagen nach 200 mg Ruscus/kg um 6% höher als die der Kontrollgruppe. Um 19% über diesen Werten lag der Proteingehalt auch nach 400 mg Ruscus/kg.

Im Muskelgewebe wurde nach Verabreichung von 200 mg Ruscus/kg eine Abnahme des Flüssigkeitsaustritts um 36% erzielt. Diese Abnahme war nicht signifikant. Ein wesentlich geringerer permeabilitätsmindernder Effekt kam nach Applikation von 400 mg/kg zustande. Der Flüssigkeitsgehalt des Ödems war um 4% erhöht (n. s.).

Auch am Flüssigkeitsgehalt des Hautgewebes konnte man bei beiden Dosierungen keinen ödemprotektiven Einfluß des Ruscus-Extraktes erkennen. Mit 0,55 ml Flüssigkeit übertrafen die Versuche der 200 mg/kg-Dosierung die Kontrollgruppe um 12%. Signifikant ($p < 0,05$) war diese ödematöse Tendenz nach 400 mg Ruscus/kg: Der Flüssigkeitsgehalt war um 48% höher als in der Kontrollgruppe.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abb. 26). Wenn die Ruscusdosis auf 400 mg/kg verdoppelt wurde, nahm im Muskelgewebe der ödemhemmende Einfluß zu. Die Steigerung der Wirkung von 25% auf 48% war nicht signifikant. An der Haut war auch nach gesteigerter Dosis keine ödemhemmende Wirkung zu erkennen. Der Proteingehalt war nicht signifikant erniedrigt, es bestand eher die Tendenz zu einer ödematösen Wirkung.

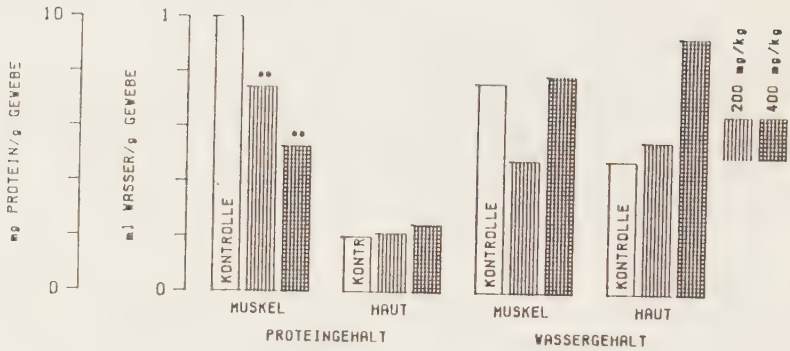


Abb.: 21 Ödemprotektiver Effekt von Ruscus nach oraler Anwendung

Wie bei TMHC war im wesentlichen der Proteinübertritt im Muskelgewebe zu unterbinden.
Fallzahlen und Standarderror siehe Tab. 11.

Der Flüssigkeitsaustritt im Muskelgewebe war nur bei 200 mg Ruscus/kg zu hemmen. Ebenso war auch im Hautgewebe nach 400 mg Ruscus/kg das Flüssigkeitsödem nicht vermindert, sondern um 48% erhöht. Bei fehlen- der Signifikanz ist eine Tendenz zu einer ödematösen Wirkung bei Dosissteigerung zu beschreiben.

- Kreislaufwirkung

Blutdruck. Der arterielle Mitteldruck unterschied sich nach oraler Ruscusgabe nicht signifikant von den Kontrollen.

Peripherer Widerstand (Abb. 20; Tab. 13). Wie bereits nach oraler Applikation von TMHC, so konnte auch nach oraler Ruscus-Gabe ein ver- mindeter Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Per- fusion registriert werden. Ruscus reduzierte den Druckanstieg um

97% in der 200 mg/kg-Dosierung, ($p = 0,01$). Nach 400 mg/kg war der Perfusionsdruck um 75% vermindert, ($p = 0,02$).

Venentonus. Ein Einfluß von Ruscus auf das intravasale Volumen des Beines war nicht zu registrieren.

- Zusammenfassung: TMIC und Ruscus-Extrakt, oral

Wenn man den Effekt von Ruscus auf Muskel- und Hautgewebe vergleicht, so zeigt sich eine mäßige proteinhemmende Wirkung am Muskel und keine Hemmung bzw. eher eine Erhöhung des Proteinödems an der Haut.

Der Flüssigkeitsgehalt im Muskel war minimal abgeschwächt, in der Haut war eher ein ödematöser Einfluß durch Ruscus zu verzeichnen. An Haut- und Muskelgewebe gleichermaßen wurde durch Ruscus der Flüssigkeitsgehalt des Ödems weniger abgeschwächt als der Proteingehalt. Im Hautgewebe waren nach Ruscus-Gabe sowohl Flüssigkeits-als auch Proteingehalt erhöht.

Für den Vergleich der Wirkungen von TMIC und Ruscus muß die unterschiedliche Dosismenge beachtet werden. Ruscus wurde jeweils doppelt so hoch dosiert wie TMIC. Aufgrund dieser Voraussetzung konnte bei Gegenüberstehen von Wirkungsäquivalenten auf eine größere Wirkung des TMIC geschlossen werden (Forth et al. 1980). Dieser Fall trat ein, wenn die Proteinhemmung der beiden Substanzen am Muskelgewebe verglichen wurde. Für TMIC ergab sich in der Dosisgruppe von 100 mg/kg eine Proteinminderung um 27%, für Ruscus in der Dosisgruppe von 200 mg/kg eine um 25%. Ein ähnliches Bild bot sich, wenn man die beiden Gruppen mit höherer Dosierung gegenüberstellte.

TMIC zog in der 200 mg-Dosierung eine Proteinhemmung um 63% nach sich, Ruscus in der 400 mg-Dosierung eine um 48%: Daraus resultiert eine ausgeprägtere proteinhemmende Wirkung von TMIC am Muskel.

Die Verhältnisse der Abb. 26 zeigen, daß TMIC nur im Muskelödem den Proteingehalt stärker hemmte als Ruscus (in vergleichbarer Dosis). Beim Proteingehalt des Hautgewebes machte sich der ödemfördernde Effekt des TMIC bei Dosiserhöhung deutlicher bemerkbar als bei Ruscus. Die Ödemflüssigkeit wurde in Muskel- und Hautgewebe nach oraler TMIC-Applikation ebenfalls stärker erhöht als nach Ruscus-Gabe. Dies deutete darauf hin, daß die Permeabilität für Flüssigkeit in Muskel- und Hautgewebe bereits bei niedrigen TMIC-Dosen vermehrt war, etwa bei 100 mg/kg. Bei Ruscus trat der gleiche Effekt auf, wenn mehr als 200 mg/kg oral appliziert wurden.

Sowohl bei TMIC wie bei Ruscus führte die orale Applikation zu einer signifikanten Beeinflussung des peripheren Widerstandes. In allen vorliegenden Dosierungen kam es nicht zu der massiven Zunahme des Perfusionsdruckes, wie sie bei Kontrollversuchen aufgetreten war. Da das interstitielle Ödem nicht generell vermindert, sondern teilweise sogar vermehrt war, müssen für die Erklärung der Wirkung auf den peripheren Widerstand noch andere Gründe geltend gemacht werden.

3.5.3 Ruscogenin, 20 mg/kg und 80 mg/kg (Abb. 24; Tab. 12)

Ruscogenin wurde 4 Stunden vor Kapillarschädigung oral appliziert. Es wurde 1%ig in Polyäthylenglykol gelöst. Die niedrige orale Dosis von 20 mg sollte in Beziehung mit der intravenösen Dosis von 4 mg Rückschlüsse auf die Resorptionsquote zulassen. Wegen der Fettlöslichkeit von Ruscogenin wurde eine Resorptionsquote von über 10% erwartet. Die hohe Dosis von 80 mg sollte einen Vergleich mit der Ruscus-Dosis von 400 mg oral erlauben und war auf den 22%igen Saponingehalt des Extraktes abgestimmt.

Mit 20 mg setzte Ruscogenin den Proteinaustritt im Muskel signifikant ($p < 0,01$) um 57% herab. Die vierfache Dosis beeinflusste diese Größe ebenfalls signifikant ($p < 0,001$). Das Ödemprotein war um 33% geringer. Im Hautödem war nach 20 mg Ruscogenin der Proteinanteil um 51% vermindert. Es bestand keine Signifikanz. Nach erhöhter Dosis trat kein ödemprotektiver Effekt auf.

Der Flüssigkeitsaustritt im Muskelgewebe war mit 20 mg Ruscogenin um 27% zu reduzieren, jedoch nicht signifikant. Eine weit geringere Hemmung des Ödems war mit 80 mg zu erreichen. Der Flüssigkeitsgehalt war um 5% erniedrigt.

Im erzeugten Hautödem war nach 20 mg Ruscogenin ein um 35% geringerer Flüssigkeitsgehalt zu messen. Dieser ödemprotektive Einfluß war jedoch nicht signifikant. Die erhöhte Ruscogenindosis brachte Flüssigkeitswerte im Hautödem mit sich, die um 51% signifikant ($p < 0,01$) die Kontrollen übertrafen.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abb. 24). Wenn man die Dosis von 20 auf 80 mg/kg steigerte, nahm die Wirkung auf den Proteinanteil des Mus-

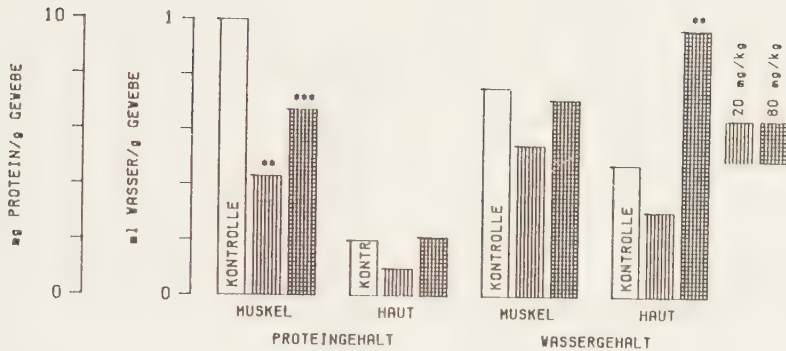


Abb.: 22 Ödemprotektiver Effekt von Ruscogenin nach oraler Anwendung

Der Proteinübertritt war vor allem im Muskelgewebe signifikant zu hemmen. 20 mg/kg waren wirkungsvoller als 80 mg/kg oral. Fallzahlen und Standarderror siehe Tab. 12.

kelödems ab. Nach 80 mg/kg lagen die Proteinwerte signifikant ($p = 0,04$) höher als nach 20 mg/kg.

An der Haut war das Proteinödem nach beiden Dosierungen nicht signifikant abgeschwächt. Nach 80 mg war sogar ein leicht ödematöser Effekt zu sehen.

Auch der Flüssigkeitsgehalt des Muskelödems wurde nicht signifikant herabgesetzt. Jedoch konnte man hier in gleicher Weise mit der niedrigeren Dosis das Ödem deutlicher hemmen als mit der höheren.

Im Hautgewebe konnte nur mit 20 mg Ruscogenin erreicht werden, daß der Flüssigkeitsaustritt gehemmt wurde. Mit der höheren Dosis wurde es verstärkt und lag um 51% signifikant ($p < 0,01$) über den Kontrollwerten.

Insgesamt war in Muskel- und Hautgewebe das Etacrynsäureödem durch die niedrige Ruscogenindosis deutlicher abzuschwächen als durch die 4-fach höhere.

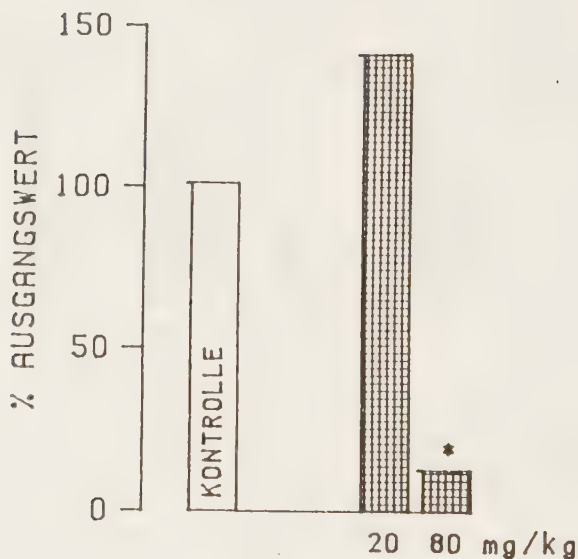


Abb.: 23 Einfluß von Ruscogenin auf den Perfusionsdruck nach oraler Gabe

Dargestellt ist der Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Perfusion. Während bei Kontrollen ein Anstieg um 101%, bezogen auf den Ausgangswert, zu verzeichnen war, schien Ruscogenin einen dosisabhängigen Effekt auf den peripheren Widerstand zu haben.

Dosis in mg/kg unter den jeweiligen Säulen, Standardabweichungen siehe Tab. 13.

- Kreislaufwirkung

Blutdruck. Das oral verabreichte Ruscogenin hatte in den angewandten Dosen keinen signifikanten Einfluß auf den arteriellen Mitteldruck der Tiere.

Tab.: 13 Anstieg des arteriellen Perfusionsdruckes während Blutperfusion
TMIC, Ruscus, Ruscogenin, oral

	Kontrolle		TMIC		Ruscus		Ruscogenin	
	n = 16		n = 5	n = 5	n = 5	n = 6	n = 5	n = 5
Dosis in mg/kg			100	200	200	400	20	80
Anstieg des P _{Perf}	+100,6% ($\pm 19,9$)		+25% ($\pm 10,7$)	-0,5% ($\pm 7,4$)	+3% ($\pm 1,9$)	+25% ($\pm 21,2$)	+144% ($\pm 39,5$)	+12,6% ($\pm 17,6$)
Signifikanz zu Kontrollen		p=0,05	p=0,014	p=0,017	p=0,02	n. s.	p=0,018	

Peripherer Widerstand (Abb. 23; Tab. 13). Die orale Gabe von 20 mg Ruscogenin/kg schien keinen Einfluß auf den peripheren Widerstand zu haben. Der Perfusionsdruck stieg während der 45minütigen Perfusion um 141% an. Es bestand in dieser Hinsicht also kein Unterschied zu Kontrollversuchen. Anders nach der 80 mg-Dosis: Der Perfusionsdruck stieg nur um 12,6% und lag damit signifikant unter dem Anstieg bei Versuchen ohne Pharmakon ($p = 0,02$). Somit herrschte nach 80 mg Ruscogenin/kg ein niedrigerer peripherer Widerstand als nach 20 mg/kg.

Venentonus. Das intravasale Volumen war im Vergleich zu den Kontrollversuchen nicht signifikant verändert.

3.5.4 Vergleich und Zusammenfassung: Ruscus - Ruscogenin, oral.

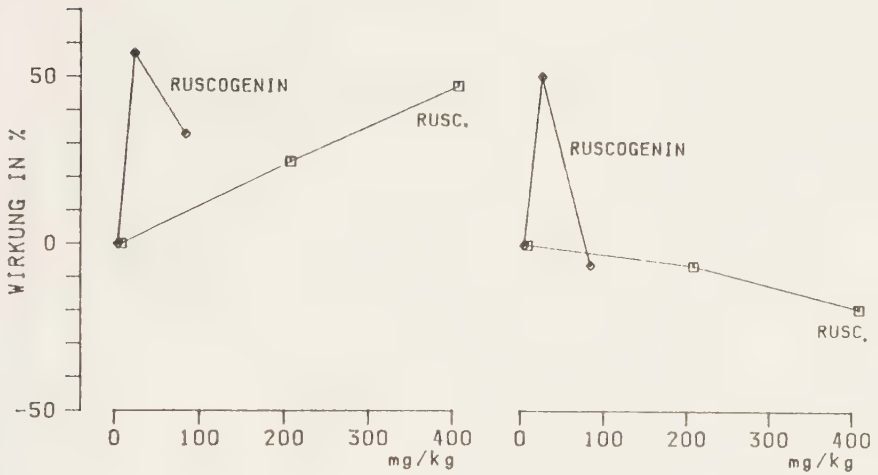
Bei 80 mg Ruscogenin/kg ausgeprägter als bei 20 mg/kg waren Protein- und Flüssigkeitsaustritt im Muskelgewebe stärker zu hemmen als im Hautgewebe. Der Flüssigkeitsgehalt wiederum war um 20 - 30% weniger reduziert als der Proteingehalt.

Wie in Punkt 3.3.3 ausgeführt, betrug der Ruscogeninanteil am vorliegenden Ruscus-Extrakt 2%. Ausgehend von der oralen Ruscusdosis von 200 mg würde die dazu korrespondierende Ruscogenindosis 4 mg betragen, vorausgesetzt man könnte die Wirkungsweise des Ruscus-Extraktes quantitativ und qualitativ auf seinen Ruscogeninanteil zurückführen. In der zunächst behandelten Gruppe wurde Ruscogenin mit der 5-fachen Menge, also mit 20 mg/kg dosiert: Die ödemprotektive Wirkung im Etacrynsäureödem war um durchschnittlich 30% stärker als nach 200 mg Ruscus/kg oral. Eine Zusammenschau der Meßwerte nach Ruscus-Extrakt und nach Ruscogenin ergab folgendes:

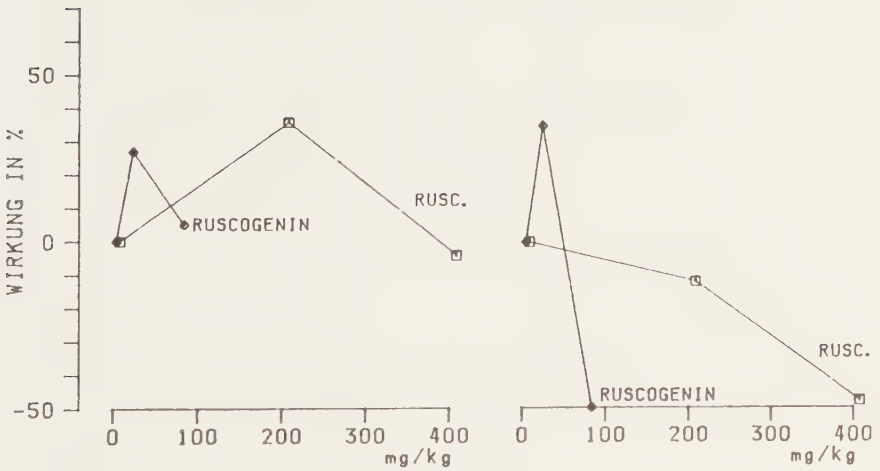
- Ruscogenin war in einer Dosis, die 10% der Ruscusmenge beträgt, wirksamer als Ruscus,
- es war deshalb nicht auszuschließen, daß Ruscogenin in einer Dosis von 2% der Ruscusextraktmenge, einer Menge, die dem Ruscogeninanteil am Ruscus-Extrakt entspräche, wirkungsäquivalent zu Ruscus wäre.
- Dosiserhöhung bei Ruscogenin erhöhte die Protein- und Flüssigkeitspermeabilität.
- Erhöhung der Ruscusextraktdosis förderte ebenfalls Protein- und Flüssigkeitspermeabilität, mit Ausnahme am Proteinödem des Muskels (Abb. 24).
- der periphere Widerstand wurde durch orale Ruscusgabe wie durch orale Ruscogeningabe günstig beeinflusst. Ein Ansteigen des Widerstandes im Zuge der Ödementstehung wurde gemindert.

3.5.5 Vergleich Ruscogenin i. v. - Ruscogenin oral.

Ruscogenin wurde oral mit der 5 - 20-fach höheren Dosis (20 mg/kg und 80 mg/kg) wie i. v. (4 mg/kg) verabreicht. Oral wie i. v. war die Substanz in Polyäthylenglykol gelöst. Aus den Tab. 7 u. 12 wird ersichtlich, daß sich die Wirkungen nach i. v. und nach oraler Gabe in etwa glichen. Hieraus ergaben sich Wirkungsäquivalente, die aufgrund der unterschiedlichen Dosierungen den Schluß gestatteten, daß



a.) Wirkung auf den Proteingehalt des Ödems
in Muskelgewebe in Hautgewebe



b.) Wirkung auf den Flüssigkeitsgehalt des Ödems
in Muskelgewebe in Hautgewebe

Abb.: 24 Ödemprotektive Wirkung von Ruscogenin und Ruscus-Extrakt
nach oraler Anwendung

Dargestellt ist die prozentuale Hemmung des Protein- und Flüssigkeitsgehaltes im Etacrynsäureödem am Katzenhinterlauf. 100% Wirkung entspräche einer völligen Hemmung des Ödems, bezogen auf die jeweiligen Kontrollwerte ohne ödemprotektive Pharmaka. Negative Wirkung bedeutet: vermehrtes Ödem. Dosis in mg/kg. Fallzahlen und S_E siehe Tabellen.

Ruscogenin i. v. wirksamer war als oral. Umgekehrt konnte gefolgert werden, daß oral ungefähr die 5-fache Dosis nötig war, um der i. v.-Wirkung vergleichbare Effekte hinsichtlich der Ödemhemmung zu erzielen.

Der Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45minütigen Perfusion wurde nach intravenöser Ruscogeningabe nicht vermindert. Nach oraler Gabe schien ein dosisabhängiger Effekt zu bestehen: Erst die Steigerung der Dosis von 20 auf 80 mg/kg führte zu einer signifikanten Beeinflussung des Perfusionsdruckes.

3.6 Verumversuche, orale Anwendung

Kombination von TMHC und Ruscus-Extrakt

(Abb. 26; Tab. 14)

Die Kombination aus 100 mg TMHC/kg und 200 mg Ruscus/kg wurde in wässriger Lösung etwa 4 Std. vor der Gefäßschädigung (Etacrynsäure) oral verabreicht. Dosisangaben beziehen sich jeweils auf 1 kg Körpergewicht.

Wurde obige Wirkstoffkombination appliziert, ließ sich der Proteingehalt des entstehenden Muskelödems um 66% vermindern, $p < 0,0001$.

Nahezu gleich war die Wirkung in der Haut, wo der Proteinaustritt ins Gewebe um 60% zu unterbinden war. Hierbei war allerdings keine Signifikanz gegeben.

Der Flüssigkeitsanteil des Muskelödems war signifikant ($p = 0,01$) um 51% abgeschwächt. Es wurden 0,37 ml Flüssigkeit im Vergleich zu 0,76 ml bei Kontrollen gemessen.

Im Hautgewebe hingegen hatte die Kombination auf die Ausbildung des Flüssigkeitsödems keinen signifikanten Einfluß. Es war ein Rückgang des Flüssigkeitsgehaltes um 25% auf 0,36 ml zu verzeichnen.

- Kreislaufwirkung

Der mittlere arterielle Druck sowie das intravasale Volumen des Beines unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollen. Der periphere Widerstand wurde ebenfalls nicht signifikant beeinflusst: Der Perfusionsdruck stieg während der 45minütigen Perfusion um 91,6% an, bei Kontrollen um 100,6% (Abb. 20; Tab. 15). Desgleichen war das intravasale Volumen des Beines nicht signifikant verändert.

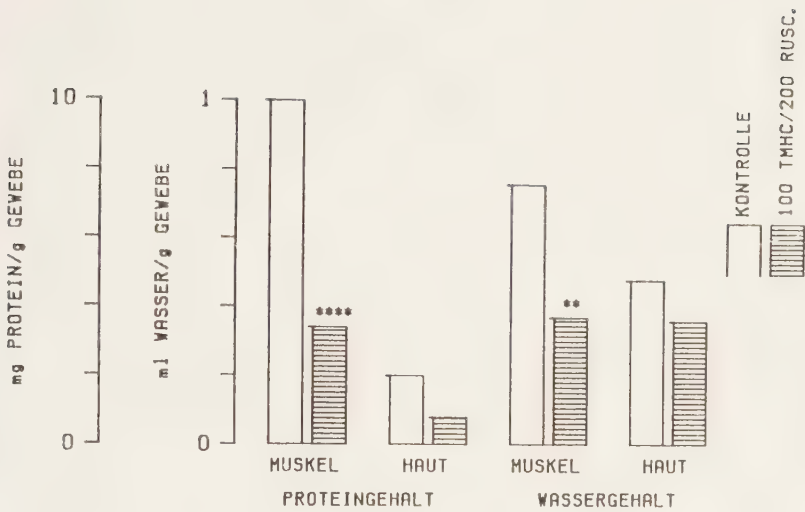


Abb.: 25 Ödemprotektive Wirkung von TMHC und Ruscus bei kombinierter Anwendung (oral)

Dosierung: 100 mg TMHC und 200 mg Ruscus/kg.

Im Vergleich zur Einzelanwendung war der ödemprotektive Effekt deutlicher. Wie nach intravenöser Dosierung waren synergistische Verstärkungen zu registrieren. Fallzahlen und Standarderror siehe Tab. 14.

3.6.1 Kombination und Einzelsubstanzen, oral - Vergleich

Nachdem TMHC und Ruscus nach oraler Applikation nur jeweils im Muskel das Etacrynsäureödem signifikant unterbinden konnten, interessierte die Frage, ob die beiden Pharmaka kombiniert deutlicher ödemprotektiv wirksam waren.

Im Muskel war das Proteinödem durch TMHC (100 mg) und Ruscus (200 mg) um 27 bzw. 25% signifikant einzuschränken. Kombiniert (100 mg TMHC und 200 mg Ruscus) gelang eine signifikante Steigerung auf 66% ($p < 0,05$). Somit konnte von einem additiven Effekt der beiden Substanzen gesprochen werden.

Tab.: 14 Hemmung des Etacrynsäureödems durch TMHC und Ruscus-Extrakt in Kombination, oral

Dosis: 100 mg TMHC, 200 mg Ruscus (n = 5)

	Kontrolle	TMHC/Ruscus	Prozentuale Hemmung
Muskel		****	
mg Öd.prot./g	10;01	3,40	66%
Trock.gew.	(⁺ 0,41)	(⁺ 0,61)	
Haut			
mg Öd.prot./g	1,99	0,78	60%
Trock.gew.	(⁺ 0,33)	(⁺ 0,62)	
Muskel		**	
ml Öd.flüss./g	0,76	0,37	51%
Trock.gew.	(⁺ 0,07)	(⁺ 0,10)	
Haut			
ml Öd.flüss./g	0,48	0,36	25%
Trock.gew.	(⁺ 0,04)	(⁺ 0,08)	

In der Haut war auch nach kombinierter Verabreichung von TMHC und Ruscus das Proteinödem nicht signifikant zu hemmen. Jedoch legte die Ödenhemmung um 60% (Tab. 14; Tab. 11) eine additive Verstärkung der Kombination im Verhältnis zur Einzelanwendung (Ödenhemmung um 3%) nahe.

Das Flüssigkeitsödem im Muskel war nur durch die Kombination signifikant zu reduzieren. Vergleicht man die Ergebnisse von TMHC (100 mg) und Ruscus (200 mg), so konnte wieder eine additive Verstärkung durch die Kombination angenommen werden (Tab. 14; Tab. 11).

Auch in der Haut war der Flüssigkeitsgehalt des Ödems nur durch kombinierte Gabe der beiden Pharmaka zu vermindern. Unter der Einschränkung, daß dieser Effekt nicht signifikant war, lag auch in diesem Bereich der ödemprotektiven Wirkung eine additive Verstärkung von TMHC und Ruscus vor.

Tab.: 15 Anstieg des arteriellen Perfusionsdruckes
während Blutperfusion
TMIC und Ruscus in Kombination, i. v. und oral

		i. v.	i. v.	i. v.	oral
	n = 16	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Dosis in mg/kg	Kontrolle	TMIC/Rusc 10/10	TMIC/Rusc 10/20	TMIC/Rusc 20/20	TMIC/Rusc 100/200
P _{Perf}	+100,6% ([±] 19,9)	+38% ([±] 23,2)	+56,6% ([±] 31,5)	-5,8% ([±] 9,0)	+91,6% ([±] 30,0)
p zu Kontrolle		p = 0,07	n. s.	p = 0,005	n. s.

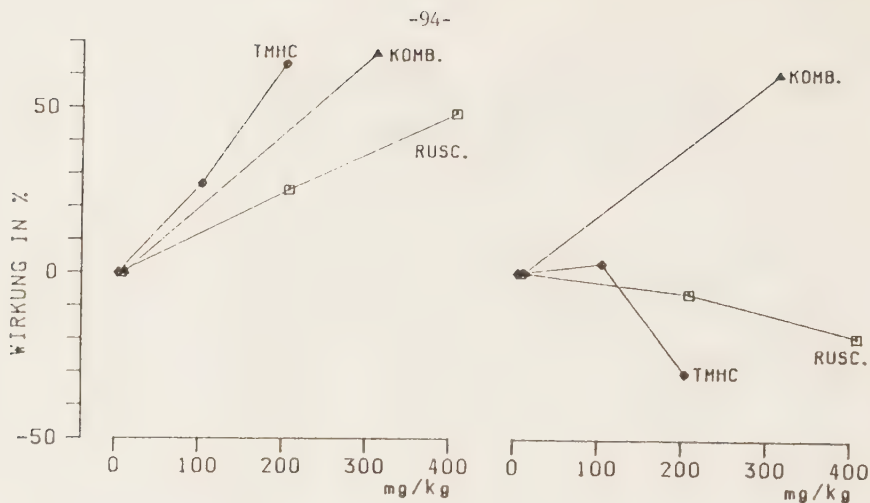
Abschließend kann sowohl für Haut wie für Muskulatur eine additive Verstärkung der ödemprotektiven Wirkung von TMIC und Ruscus konstatiert werden.

3.6.2 i.v. und orale Applikation von TMIC und Ruscus - Vergleich

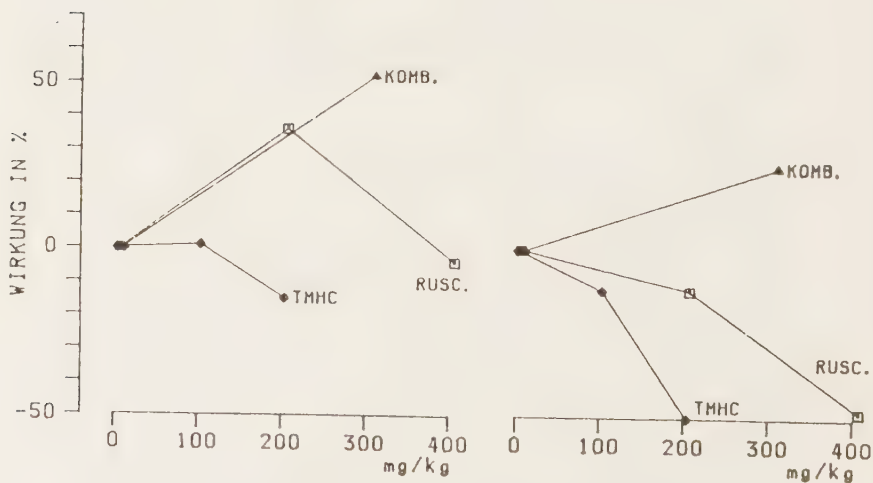
Mit Ausnahme des Proteinödems am Muskel vermochte TMIC nach oraler Applikation den Protein- und Flüssigkeitsaustritt in Haut- und Muskelgewebe nur ungenügend zu hemmen. In höherer Dosierung (200 mg/kg) trat durchwegs ein permeabilitätsfördernder Effekt für Proteine und Flüssigkeit auf. Für Ruscus galten fast identische Aussagen: Nach oraler Applikation waren Flüssigkeits- und Proteingehalt des Hautödems nicht vermindert, sondern mit steigender Dosis erhöht. Die Ödemhemmung am Muskel war nur beim Proteingehalt eindeutig.

Intravenös verabreicht wirkten TMIC und Ruscus bei Flüssigkeits- und Proteinpermeabilität des Muskels signifikant hemmend. Im Hautgewebe wirkte nur Ruscus signifikant ödemhemmend. Weder bei TMIC noch bei Ruscus traten nach i. v.-Gabe permeabilitätssteigernde Effekte auf.

Bei oralen Gaben deutlicher als nach intravenösen hatten TMIC und Ruscus einen dämpfenden Effekt auf die Zunahme des peripheren Widerstandes während der 45minütigen Perfusion.



a.) Wirkung auf den Proteingehalt des Ödems
in Muskelgewebe in Hautgewebe



b.) Wirkung auf den Flüssigkeitsgehalt des Ödems
in Muskelgewebe in Hautgewebe

Abb.: 26 Ödemprotektive Wirkung von TMHC und Ruscus-Extrakt nach oraler Anwendung

Dosisabhängiger Verlauf der Wirkung von TMHC, Ruscus-Extrakt und Kombinationen dieser Substanzen (TMHC : Ruscus wie 1 : 2) auf das Etacrynsäureödem am Katzenhinterlauf.
Dargestellt ist die prozentuale Hemmung des Protein- und Flüssigkeitsödems in Muskel- und Hautgewebe. 100% Wirkung entspräche einer völligen Hemmung des Etacrynsäureödems. Negative Wirkung bedeutet Ödemvermehrung.
Dosis in mg/kg.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Substanzen TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin sollten am Hinterlauf der Katze ein Ödem, das durch Etacrynsäure hervorgerufen wurde, ganz oder teilweise verhindern. Zur Beurteilung des Ödems wurde in Haut- und Muskelgewebe gesondert der Gehalt an markiertem Plasma-protein und an Flüssigkeit bestimmt. Weiterhin interessierte, ob die Pharmaka sowohl nach intravenöser wie nach oraler Applikation wirksam sind. Aus den erforderlichen Dosierungen sollten Rückschlüsse über das Ausmaß einer enteralen Resorption der jeweiligen Substanzen ermöglicht werden.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist die willkürlich festgesetzte Versuchsdauer (45 Minuten Beinperfusion nach beendeter Gefäßschädigung durch Etacrynsäure, Abb. 3) bindend. Die Ergebnisse stellen Momentaufnahmen im dynamischen Prozeß einer Ödementstehung dar. Hätte man die Perfusion des Beines lange genug fortgesetzt, hätten sich trotz ödemprotektiver Pharmaka die Ödeme weiter bis zu einem definierbaren Fließgleichgewicht ausgebildet. Die positive Wirkung der untersuchten Pharmaka liegt vermutlich vor allem in der zeitlichen Verzögerung einer standardisierten Ödemausbildung.

Von einer Kombination aus TMIC und Ruscus-Extrakt wurde wegen postulierter, unterschiedlicher Ansatzpunkte ihrer Wirkungen ein besonders effektiver ödemprotektiver Einfluß erwartet. Auch dies wurde nach intravenöser und nach oraler Applikation getestet. Da Ruscogenin, ein Steroidsapogenin, im Ruscus-Extrakt enthalten ist, konnte geprüft werden, ob die Wirkung des Gesamtextraktes gegen Ödeme auf diese Einzelkomponente zurückzuführen ist. Andernfalls müßte angenommen werden, daß noch andere Bestandteile des Ruscus-Extraktes in diesem Sinne zur Geltung kamen. Viel diskutiert im Zusammenhang mit Flavonoiden und Steroidsaponinen ist ihre gefäßaktive Potenz. Soweit es methodisch möglich war, wurde versucht, den Einfluß der Pharmaka auch in dieser Richtung zu untersuchen.

4.1 Einflüsse der Etacrynsäure

Morphologische Veränderungen. Über die Möglichkeit, mit Etacrynsäure biologische Membranen und insbesondere Endothelgewebe von Blutgefäßen zu schädigen, berichten Hammersen, Hammersen (1983) und Felix (1983 a). Von Hammersen F. und Hammersen E. (1983) wurden die Auswirkungen der Etacrynsäureperfusion auf die Endothelstruktur in der Endstrombahn untersucht. Zur elektronenoptischen Untersuchung kam Skelettmuskelgewebe der Katze, das in der eingangs beschriebenen Methode zunächst mit Etacrynsäure und anschließend 45 Minuten wieder mit Blut perfundiert worden war.

Im Vergleich mit den Endothelveränderungen, die Hammersen (1960, 1972 a, b, 1982) an verschiedenen Ödemmodellen beobachtet hat, fällt im Etacrynsäureödem ein gehäuftes Auftreten von intravasalen Zellaggregaten auf. Diese bestünden überwiegend aus Thrombozyten. Durch sie würden sowohl arterielle als auch venöse Gefäße zum Teil verlegt. Zwar wurde in nur einem einzigen Fall intravasales Fibrin mit Sicherheit nachgewiesen, aber die intravasale Thrombozytenaggregation könnte mit der bekannten Reaktion von Thrombozyten auf geschädigte Endothelzellen (Harper et al. 1975) zusammenhängen.

Im Unterschied zu typisch entzündlichen Ödemen vom Histamintyp sind beim Etacrynsäureödem nicht nur die kleinen und kleinsten Venulen, sondern auch die Kapillaren von Endothelveränderungen betroffen (Hammersen, Hammersen 1983). Eine weitere deutliche Abgrenzung zum durch Histamin induzierten Ödem liege im Fehlen von interendothelialen Lücken, sogenannten "gaps", die für entzündliche Ödemformen charakteristisch seien. Das Endothel sei deutlich flacher als normal und dicht vesikuliert.

Die Vorstellung, daß die Permeabilität durch die verkürzte Diffusionsstrecke und die erhöhte Vesikelzahl gesteigert ist, kann den erhöhten Protein- und Wassergehalt der Skelettmuskulatur und der Haut erklären.

In die gleiche Richtung weisen auch gehäuft nachgewiesene transendotheliale Kanäle und tiefe Invaginationen des luminalen Plasmalemm.

Eine Besonderheit des Etacrynsäureödems waren "blasenförmige Vortreibungen des endothelialen Plasmalemm" von unterschiedlicher Größe (Hammersen, Hammersen 1983). Sie seien ausschließlich lumenwärts gerichtet und in Arterien wie in allen anderen Gefäßen der terminalen

Strombahn anzutreffen. Durch sie könne bei entsprechender Zahl und Größe auch das Lumen völlig verlegt werden. Möglicherweise liegt darin in Verbindung mit den Thrombozytenaggregaten die Ursache für den gesteigerten peripheren Widerstand bei Perfusion des Beines nach der Ödemerzeugung mit Etacrynsäure, wenn nicht vorher ödemprotektive Pharmaka verabreicht wurden.

Diese Endothelblasen, die beim Etacrynsäureödem beobachtet werden, sind häufig registrierte Reaktionsformen der Endothelzellen auf unterschiedliche schädigende Einflüsse (Hammersen, Hammersen 1983 a, b). Sie seien Ausdruck eines begrenzten Zellödems und beruhten auf einer lokalen Membranschädigung der Endothelzellen.

Biochemische Einflüsse. Der Ort der diuretischen Wirkung der Etacrynsäure ist lange bekannt. Nach Burg und Green (1973) vermindert Etacrynsäure den aktiven Chloridtransport am aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife. Jedoch ist der allgemeine biochemische Hintergrund dazu noch in wissenschaftlicher Diskussion. Manuel und Weiner (1976) berichteten, daß Etacrynsäure die Atmung isolierter Mitochondrien beeinträchtige. Dabei soll es zu einer Entkopplung in der Atmungskette kommen. Entkoppelung bedeutet (Harper et al. 1975), daß Oxidationsvorgänge innerhalb der Atmungskette von den Phosphorylierungsvorgängen abgetrennt werden. Die Folge ist eine sogenannte unkontrollierte Atmung, bei der letztendlich die Energie der Redoxreaktionen nicht mehr auf energiereiche Phosphatverbindungen übertragen wird, sondern in Wärme umgesetzt wird. Von Yanase et al. (1983) wurden Mitochondrien der Rattenniere unter obiger Fragestellung geprüft. Sie berichten, daß Etacrynsäure als ein Entkoppler in der Atmungskette wirke. Zum anderen behindere Etacrynsäure das System des Elektronentransports in Mitochondrien.

Es bliebe nun zu klären, inwieweit dieser Eingriff der Etacrynsäure in den Energiestoffwechsel auch an Endothelzellen zur Geltung kommt. Wenn Etacrynsäure hier die aktive Leistung des Stoffwechsels wirksam herabsetzen würde, wäre dies eine Erklärung für die beobachtete Schrankenstörung zwischen intravasalem und extravasalem Raum. Damit wäre auch die Möglichkeit gegeben, die Frage nach der Genese des Etacrynsäureödems zu beantworten. Histologische Befunde sprechen für eine nichtentzündliche Wirkung dieser Substanz, wie oben ausgeführt. Dies würde durch die Ergebnisse von Yanase et al. (1983) unterstützt, vorausgesetzt, sie ließen sich auf Endothelzellen übertragen.

Demnach beruhte der ödemerzeugende Effekt der Etacrynsäure auf einer Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels in Endothelzellen.

4.2 Dynamik der Ödementstehung

Flüssigkeits- und Proteingehalt des Ödems (Abb. 27). Im Hautgewebe schienen Flüssigkeitsödem und Proteinödem während der 45minütigen Perfusionszeit in ihrer Entstehung zeitlich gekoppelt zu sein: Sowohl Flüssigkeitsgehalt als auch Proteingehalt korrelierten signifikant mit dem Ausmaß des akuten Ödems. Während der Etacrynsäureperfusion und der Spülphase mit Kochsalz konnte aber nur Flüssigkeit ins Interstitium übergetreten sein, Plasmaproteine konnten erst bei der anschließenden Blutperfusion ins Interstitium gelangen. Eine Aussage über die zeitliche Kopplung der Permeation von Flüssigkeit und Proteinen in der Phase des akuten Ödems war deshalb, methodisch bedingt, nicht möglich. Vielmehr schien die Endothelschädigung im Hautgewebe zu bewirken, daß der überwiegende Anteil des Flüssigkeitsödems noch während der Spülung mit Kochsalz ins Interstitium gelangte.

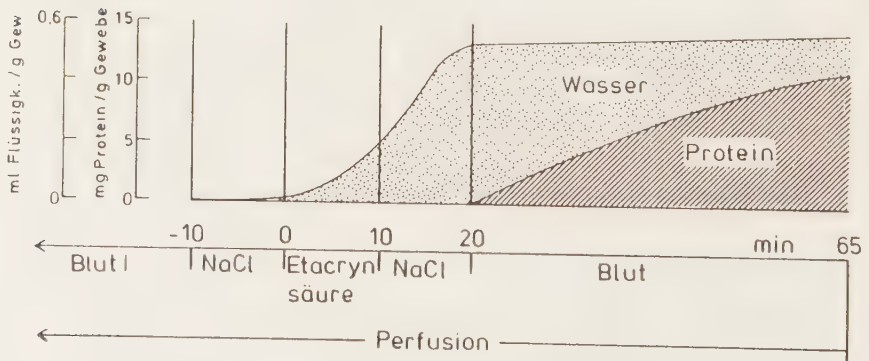


Abb.: 27 Zeitlicher Ablauf der Ödementstehung (nach Felix et al.1983 b).

Der Übertritt von Flüssigkeit ins Interstitium begann bereits unmittelbar nach der Endothelschädigung mit Etacrynsäure. Der Proteinaustritt ins Interstitium konnte hingegen erst während der anschließenden normalen Perfusion mit Blut stattfinden.

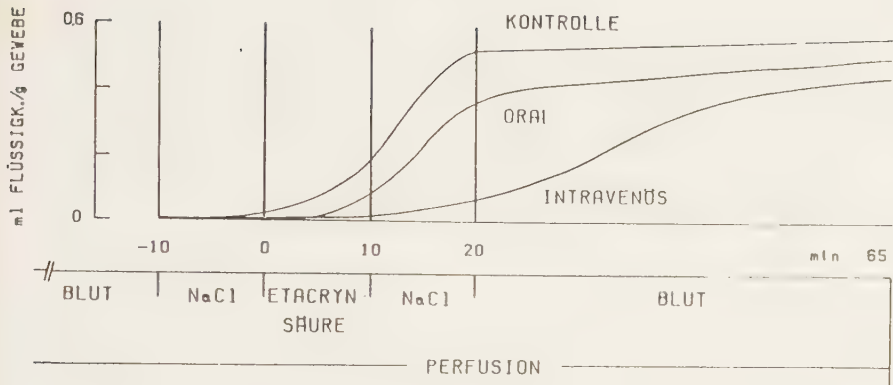


Abb.: 28 Entwicklung des Ödems in Abhängigkeit von der Applikationsform ödemprotektiver Substanzen

Bei Kontrollversuchen bildete sich der Hauptanteil des Flüssigkeitsödems noch während der Perfusion mit isotoner Kochsalzlösung aus. Wurden vorher ödemprotektive Substanzen intravenös verabreicht, verzögerte sich die Ausbildung des Ödems. Nach oraler Applikation war der antiödematöse Schutz geringer als nach intravenöser, jedoch war er während des Versuches konstanter.

In der nun anschließenden Phase der Blutperfusion überwogen bei der Permeation ins Interstitium die Plasmaproteine, denn volumenmäßig fand keine signifikante Flüssigkeitsverlagerung ins Interstitium mehr statt. Die signifikante Korrelation zwischen dem Ödemproteingehalt der Haut und der Ausbildung des akuten Ödems bedeutete folglich, daß ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Etacrynsäureschädigung und der Proteinpermeation ins Interstitium nachzuweisen ist.

Für die Vorstellung über Flüssigkeits- und Proteinverlagerungen während der Ödementstehung im Muskelgewebe galt prinzipiell genauso, daß Proteinpermeation erst in der Phase der Blutperfusion

möglich war. Die signifikante Korrelation zwischen Proteinödem und Ausmaß des akuten Ödems machte also auch am Muskelgewebe einen Zusammenhang zwischen Etacrynsäureschädigung und Höhe des Proteinödems wahrscheinlich. Methodisch bedingt entstand das Flüssigkeitsödem bereits in der Schädigungsphase, das Proteinödem dann zusätzlich während der Blutperfusion (Abb. 27).

Einfluß der Pharmaka (Abb. 28). Durch die angewandten Pharmaka ließ sich das Etacrynsäureödem wirksam unterdrücken. Dies war den erhaltenen Resultaten für den Flüssigkeits- und Proteingehalt in den Geweben zu entnehmen. Es bleibt zu klären, in welchem Abschnitt der Ödementstehung die Wirkung der Pharmaka einsetzte. Unsere Untersuchungen dazu konnten allerdings nur die Bewegungen von Flüssigkeiten, von Volumen aus dem intravasalen Raum ins Interstitium registrieren. Folglich beziehen sich die Aussagen über die Ödementstehung im weiteren auf Flüssigkeitsvolumina. Eine Unterscheidung in Haut- und Muskelödem war bei diesen Messungen nicht möglich. Auch muß berücksichtigt werden, daß die Pharmaka (TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin) in eine Gruppe zusammengefaßt und nur nach Applikationsform intravenös und oral aufgeschlüsselt sind.

Die Ergebnisse, die bei Kontrollversuchen erhalten wurden, machten deutlich, daß mehr als 50% des am Ende der 45minütigen Perfusion gemessenen Flüssigkeitsödems bereits während der Schädigungsphase entstehen. Denn zu den 12,1 ml akuten Ödems kamen noch 8,3 ml als Filtration während der Perfusionszeit hinzu. Insgesamt waren also bei Kontrollversuchen durchschnittlich 20 ml Ödemflüssigkeit im Gewebe des Katzenhinterlaufes (Abb. 7).

Aus den Angaben über die Höhe der Filtrationsmenge/min ist ersichtlich, daß diese während der Perfusionszeit noch zunimmt. Dies kann eventuell darauf zurückgeführt werden, daß die Wirkung der Etacrynsäure andauerte, obwohl diese sofort wieder ausgespült worden war. Dafür sprechen Befunde, die nach Einwirken von Etacrynsäure auf isolierte Darmabschnitte erhalten wurden (Felix et al. 1983 a). Oder es ist möglich, daß der besonders bei Kontrollversuchen ansteigende Perfusionsdruck zu der erhöhten Filtration führte (siehe unten).

Unter dem Einfluß der Pharmaka, bei Verumversuchen also, änderte sich die zeitliche Verteilung der Ödementwicklung wesentlich. Besonders nach intravenöser Applikation war das akute Ödem eindeutig (um 44%) geringer als bei Kontrollversuchen. Es liegt nahe, daraus den Schluß zu ziehen, daß die Endothelschädigung durch die Etacrynsäure in diesen Fällen weniger stark war. Möglicherweise setzte die Wirkung der Pharmaka eben schon zum Zeitpunkt der Endothelschädigung ein, indem z. B. der Einfluß der Etacrynsäure eingeschränkt wurde. Man kann vermuten, daß die intravenös verabreichten Pharmaka zu diesem Zeitpunkt zum Teil bereits in die Endothelzellen und in das angrenzende Interstitium gelangt sind und dort den Ansatzpunkt der Etacrynsäure blockierten. Oder die Pharmaka verhinderten durch Anhaften an den Endothelien, daß Etacrynsäure ungehindert ins Zellinnere diffundieren konnte.

Die Gesamtfiltration in 45 Minuten war bei Verumversuchen hingegen nur um 9,3% vermindert. Doch ist die niedrige Filtration₁₀ (Filtrationsmenge/min) ein möglicher Hinweis dafür, daß die ödemprotektive Wirkung der Pharmaka vor allem zu Beginn der Perfusion bestand und im Laufe der Zeit nachließ. Dafür spricht auch die gesteigerte Filtrationsmenge/min (um ca. 35%) gegen Ende der Perfusionszeit. Man könnte einen nachlassenden Effekt der Pharmaka damit erklären, daß ihre kurze Halbwertszeit von 1 - 4 Stunden sehr schnell den wirksamen Plasmaspiegel unterschreiten ließ. Doch war ihr ödemhemmender Einfluß immer noch so stark, daß die gesamte Ödemflüssigkeit im Bein durch die Pharmaka um 30% (im Verhältnis zu den Kontrollen) reduziert war.

In der Gruppe der oralen Applikationsform war allgemein ein schwächerer Einfluß auf die Phasen der Ödementstehung zu verzeichnen. Das dürfte mit der geringeren Wirkung der Pharmaka auf den Flüssigkeitsgehalt der Gewebe besonders nach oraler Gabe zusammenhängen. Dennoch fiel auf, daß nach oraler Zufuhr der Effekt nicht so sehr auf den Beginn der Perfusion konzentriert war wie bei intravenöser. Dies könnte mit der unterschiedlichen Kinetik der Serumspiegel nach oraler und intravenöser Zufuhr erklärt werden (siehe Kapitel Resorption).

4.3 Auswirkung von TMIC, Ruscus-aculeatus-Extrakt und Ruscogenin auf Kreislaufparameter

Blutdruckwirkung. Wie im Teil "Ergebnisse" ausgeführt, ließ sich nach intravenöser Verabreichung von TMIC in Dosen von 10, 20 und 50 mg/kg eine Senkung des arteriellen Mitteldruckes um bis zu 30% registrieren. Dieser Effekt schien dosisabhängig zu sein, dauerte aber nur wenige Minuten. Auch Ruscus-aculeatus-Extrakt bewirkte nach intravenöser Injektion einen sofortigen kurzzeitigen Blutdruckabfall.

Ein Sapogenin dieses Extraktes, Ruscogenin, zeigte bei gleicher Applikationsform in der angewandten Dosierung von 4 mg/kg keine Blutdrucksenkung. Dies ließ den Schluß zu, daß für die kurzzeitige Blutdrucksenkende Potenz von Ruscus aculeatus andere Bestandteile des Extraktes verantwortlich sein mußten.

Kombinationen aus TMIC und Ruscus-Extrakt zeigten wieder den bei Einzelapplikation beobachteten, blutdrucksenkenden Effekt.

Bohr et al. (1949) berichteten ebenfalls über einen akuten blutdrucksenkenden Einfluß von TMIC. Die Versuche wurden an Meerschweinchen und an Kaninchen durchgeführt. Allerdings ergibt sich aus den graphischen Darstellungen eine wesentlich längere Dauer dieser Wirkung, nämlich von etwa 2 - 3 Stunden. Als Mechanismus dieses Druckabfalls wurde eine viscerale Vasodilatation neben einer peripheren Vasokonstriktion diskutiert, die im Gesamtergebnis eine Abnahme des arteriellen Drucks mit sich brächte.

Caujolle et al. (1953) und Moscarella (1953) fanden bei Versuchen an Hunden eine tiefe und dauerhafte Hypotension nach i. v.-Applikation von Ruscus-aculeatus-Extrakt in toxischer Dosis. Auch bei nicht toxischer Dosierung bis 10 g/kg am Hund wurde nach intravenöser Zufuhr eine markante, aber kurz andauernde Veränderung von 20 - 30 mmHg registriert. In diesen Arbeiten wird der depressorische Effekt auf eine nicht näher bezeichnete kardiodepressorische Wirkung des Ruscus-Extraktes, nicht auf Myokardschädigung, zurückgeführt, da regelmäßig eine Verlangsamung der Herzfrequenz aufgetreten sei.

Lecomte, Van Cauwenberge (1974) beobachteten nach schneller i. v.-Gabe von Mono-hydroxyethyl-7-Rutosid (50 - 250 mg/kg) an Ratten einen hypotensiven Effekt, der nach 2 - 3 Minuten rasch einsetzt, etwa 30 - 40% des ursprünglichen Drucks beträgt und binnen 15 - 20 Minuten wieder

langsam verschwindet. Dauer und Ausmaß der Blutdrucksenkung waren dosisabhängig. Bei langsamer Injektion, d. h. 1 ml in 4 Minuten, aber gleicher Gesamtdosis, wurde keine Hypotension beobachtet, ebenfalls nicht nach intraperitonealer Applikation.

Da sich bei Injektion der Substanzen TMIC und Ruscus-aculeatus-Extrakt bei den vorliegenden Untersuchungen an der Katze keine Beeinflussung des Perfusionsdruckes erkennen ließ, entfällt als Erklärung des hypotensiven Mechanismus eine periphere Dilatation mit nachfolgendem systemischen Druckabfall. Weiter läßt sich aus Lecomte, Van Cauwenberge (1974) folgern, daß nur eine plötzliche hohe Wirkstoffkonzentration durch zügige Injektion den Mechanismus auslösen kann. Ein langsames Anfluten in nur allmählich steigender Serumkonzentration, wie es nach langsamer i. v.-Injektion, nach oraler oder intraperitonealer Zufuhr zu erwarten ist, bleibt hinsichtlich einer deutlichen Kreislaufwirkung stumm.

Dafür sprechen auch die Resultate nach oraler Applikation von TMIC, Ruscus und Ruscogenin. Hier war kein signifikanter Einfluß auf den Blutdruck der Tiere zu registrieren.

Die relativ kurze Dauer des Druckabfalls nach i. v.-Injektion könnte aus einer systemischen und/oder lokalen Kompensation der depressorischen Effekte auf humoral metabolischem oder neurogenem Weg resultieren.

Da Flavonoide und Steroidglykoside zu einem derivatspezifischen Anteil an Plasmaproteine gebunden sind (Gugler et al. 1975, Bauer-Staeb, Niebes 1976, Casley-Smith 1976, Piller 1977), besteht andererseits die Möglichkeit, daß der hohe Anteil nicht proteingebundener Substanzen bei schneller Injektion den depressorischen Blutdruckeffekt auslösen kann. Eine negativ inotrope Wirkung am Herzen, wie von Moscarella (1959) und Caujolle et al. (1953) für Ruscus aculeatus beschrieben, ist denkbar. Diese Wirkung könnte mit geringerer Konzentration des nicht proteingebundenen Wirkstoffanteils abnehmen.

Dinya, Hetényi (1979) haben über die kardiodepressive Wirkung einiger Flavonoide berichtet.

Peripherer Widerstand. Bei den Kontrollversuchen mit Etacrynsäureschädigung und nachfolgender Blutperfusion stieg der arterielle Perfusionsdruck um durchschnittlich 100,6% an. Daraus wurde auf einen

erhöhten peripheren Widerstand geschlossen. Gründe für diese Erhöhung könnten an sich mannigfaltig und einer genauen Definition nicht zugänglich sein. So führen Thulesius und Chairman (1983) 16 Parameter an, über die sich die Strömungsverhältnisse im Kapillarbereich beeinflussen lassen, wie z. B. Arteriolentonus, Fließeigenschaft des Blutes, Dehnungszustand der Gefäße, metabolische Anforderung des umgebenden Gewebes und Zustand der Endothelzellen.

In Verbindung mit den von Hammersen, Hammersen (1983) publizierten morphologischen Veränderungen am Gefäßendothel der Katze durch Etacrynsäureperfusion aber gibt es Hinweise, in erster Linie die intravasalen Thrombozytenaggregationen und die "Endothelblasen" als Ursache für den gesteigerten peripheren Widerstand anzuführen. Ebenfalls dürfte der interstitielle Druck durch das Ödem beträchtlich ansteigen und so den peripheren Widerstand erhöhen. Bei Versuchen mit O-(beta-Hydroxyethyl)-rutosiden (HR) in einer Dosis von 50 mg/kg i. v. konnten Hammersen, Hammersen (1983) elektronenoptisch eine deutliche Reduzierung der Endothelblasen und der Thrombozytenaggregate nachweisen.

Im vorliegenden Fall der intravenösen Anwendung von TMIC, Ruscus und Ruscogenin konnte mit Ausnahme von Ruscogenin ein signifikanter Einfluß auf den peripheren Widerstand ausgeübt werden (Tab. 8). Der Anstieg des peripheren Widerstandes nach Endothelschädigung konnte um 60 - 85% gedämpft werden. Es liegt nahe, zum einen in der parallel dazu beobachtbaren antiödematösen Wirkung dieser Substanzen und einem geringeren interstitiellen Druck die Ursachen dafür zu sehen. Eine Verminderung der Endothelblasen und der Thrombozytenaggregate, ein endothelschützender Effekt der Substanzen also, ist wahrscheinlich, kann aber nicht beurteilt werden und ist der Klärung durch spezielle experimentelle Untersuchungen vorbehalten. Dieser günstige Einfluß auf den peripheren Widerstand war auch nach der kombinierten Anwendung von TMIC und Ruscus zu erzielen (Tab. 15).

Ein besonderer Aspekt ergab sich bei oraler Gabe der untersuchten Pharmaka TMIC, Ruscus und Ruscogenin. Besonders was den Flüssigkeitsgehalt des Ödems anbelangte, bei höherer Dosierung aber auch beim Eiweißödem, konnte nicht von einer antiödematösen Wirkung der Substanzen gesprochen werden. Trotzdem blieb der günstige Einfluß auf den peripheren Widerstand erhalten (Tab. 13). In seiner Ausprägung war er sogar durchwegs bei oraler Anwendung der Pharmaka stärker als bei intravenöser. Die dämpfende Wirkung auf den Anstieg des peripheren Wider-

standes war also trotz erhöhtem interstitiellen Druck möglich, so daß dieser Effekt der Pharmaka nicht an eine antiödematöse Wirkung gebunden zu sein schien. Inwieweit trotz Ödementstehung Thrombozytenaggregate und Endothelblasen durch orale Anwendung obiger Pharmaka vermindert wurden, ist nicht abschätzbar. Möglicherweise hatten Effekte, wie sie von Coget (1983) beschrieben werden, eine Wirkung in diese Richtung: TMIC soll die Mikrozirkulation im Endstromgebiet verstärken, wobei eine gesteigerte Flußrate in Arterien und Kapillaren zu verzeichnen sei. Ruscus erhöhe die Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten und öffne zunächst noch unsichtbare Kapillaren.

Venentonisierung. In Veröffentlichungen über selektive Venentonisierung finden sich relativ wenige Untersuchungen mit Flavonoiden oder Flavonoidgemischen. Klemm (1979) berichtete über einen erhöhten Venentonus, epimaleolar gemessen, nach oraler Applikation von Daflon^R beim Menschen. Ebenfalls im Humanversuch untersuchten Rudofsky und Nobbe (1982) die Wirkung von TMIC (7,5 g oral) auf die Venenkapazität am Gesunden. Bei einem Teil der Probanden konnte eine signifikante Venentonisierung nachgewiesen werden, bei der anderen Gruppe eine leichte Dilatierung der venösen Gefäße. Felix (1980, 1983 b) aber kommt zu dem Schluß, daß man bei Flavonoiden und bei TMIC wohl keine venentonisierende Wirkung annehmen könne.

Eigene Versuche mit TMIC intravenös ließen keine tonisierenden Effekte auf das Venensystem erkennen.

Zahlreicher sind Untersuchungen über venentonisierende Effekte bei Steroidglykosiden aus Pflanzenextrakten, etwa dem Roßkastanien- und dem Ruscus-aculeatus-Extrakt. Eine Venentonisierung für Aescin haben Pauschinger et al. (1974) nachgewiesen, andere Autoren hingegen können diesen Effekt des Aescins bzw. des Roßkastanienextraktes nicht bestätigen (Remien et al. 1974, Lange, Echt 1972).

Angaben über eine venentonisierende Wirkung des Ruscus-aculeatus-Extraktes wurden zum ersten Mal von Moscarella (1953) und Caujolle et al. (1953) gemacht. Moscarella untersuchte tonische Kontraktionen an isolierten Hundearterien und -venen (A. femoralis, V. saphena) unter dem Einfluß von Ruscus-aculeatus-Extrakt. Aus den myographischen Versuchen ergab sich für die Vene eine achtfach stärkere tonische Kontraktion als für die Arterie. Bestätigt wurde dieser tonische Effekt durch Tarayre, Laressergues (1976). Rudofsky, Nobbe konnten an 10 Versuchspersonen eine signifikante Reduktion der Venenkapazität

30 bzw. 90 Minuten nach oraler Applikation von 7,5 g Ruscus-Extrakt nachweisen. In Studien an isolierten Venenringen aus der V. saphena des Hundes konnten Marcelon, Vanhoutte (1983) und Marcelon et al. (1983) eine dosisabhängige Kontraktion durch Ruscus induzieren. Dabei postulieren sie als Wirkmechanismus des Ruscus-Extraktes eine Freisetzung gespeicherten Noradrenalins aus den sympathischen präsynaptischen Vesikeln. Weiter soll Ruscus direkt α_1 - und α_2 -Rezeptoren der glatten Muskelzelle im Sinne direkter Sympathomimetika stimulieren. Sowohl an isolierten Venen als auch in vivo am Hund konnten Laressergues, Vilain (1983) eine vasokonstriktive Wirkung des Ruscus-Extraktes registrieren.

Aus den unserer Arbeit zugrunde liegenden Resultaten nach intravenöser Gabe von Ruscus-Extrakt und dessen Sapogenin Ruscogenin kann nicht auf eine Venentonisierung dieser Substanzen geschlossen werden. Es konnte keine Änderung der Kapazität des venösen Systems am untersuchten Hinterlauf der Katze registriert werden. Die Beobachtung des venösen Rückstroms war kontinuierlich möglich (graphische Registrierung über Schreiber), so daß sowohl eine akute als auch eine allmähliche Änderung des kapazitiven venösen Volumens erkennbar gewesen wäre.

Allerdings ist hier anzufügen, daß die angewandte Methodik primär einer Untersuchung der antiödematösen Wirkung von Pharmaka zu dienen hatte. Für eine spezielle Beurteilung möglicher vasoaktiver Effekte wäre eine mehrmalige Applikation über mehrere Dosismbereiche und eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum hinweg notwendig. Insofern ist die Aussage über eine fehlende vasokonstriktorische Wirkung der angeführten Pharmaka unter dieser Einschränkung zu sehen. Weiter könnte die Nar-kose der Tiere den Sympathotonus, der für die durch Ruscus verstärkte Noradrenalin-Wirkung (Marcelon, Vanhoutte 1983) notwendig ist, soweit abschwächen, daß der venentonisierende Effekt des Ruscus stark vermindert ist (Felix et al. 1983 b).

Wirkung auf Lymphgefäße. Vogel, Ströcker (1966) weisen in Untersuchungen über Lymphfluß und Permeabilität intakter Gefäße einen sogenannten "lymphagogen" Effekt von Quercitrin und Trimethylrutin nach. Für TMIC konnte diese Eigenschaft eines die Lymphtransportmenge steigernden Effektes nicht aufgezeigt werden. Földi, Földi-Borcsök (1973), Casley-Smith, Piller (1973), Kriz (1975) und Casley-Smith (1976) fordern für Coumarin einen "digitalis"-ähnlichen Einfluß auf die Aktion der Lymphbahnen.

Aufgrund der angewandten Methodik kann in unseren Versuchen ein etwaiger ödemreduzierender Einfluß von TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin über eine Erhöhung der geförderten Lymphmenge ausgeschlossen werden: Durch Präparation und zu Beginn der Perfusion erfolgende Ligierung der Oberschenkelhaut und -muskulatur ist ein Lymphabfluß aus dem Bein so gut wie ausgeschlossen.

Es ist folglich keine Aussage über eine Einwirkung der untersuchten Pharmaka TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin auf das Lymphsystem möglich.

Wegen dieser Unterbindung jedoch von einem vorliegenden lymphostatischen Ödem zu sprechen, ist hinsichtlich der relativ kurzen Unterbindungszeit von ca. 2 Std. und der Ödembildung durch massive Endothelschädigung der Etacrynsäure wohl nicht angebracht. Casley-Smith, Piller (1973) produzieren an Rattenextremitäten lymphostatische Ödeme nach 12stündiger Ligatur der Weichteile: Das entstehende Ödem bezeichnen sie als initiales Stadium eines akuten Lymphödems.

4.4 Auswirkung von TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin auf das Etacrynsäureödem

Reduktion der Permeabilität.

In Experimenten zur Beeinflussung der Kapillarpermeabilität fanden Tarayre, Laressergues (1975) eine Permeabilitätsreduktion durch orale und intravenöse TMIC-Gabe bei Ratte und Kaninchen. Als Ödemmodelle wurden mit Histamin, Bradykinin und Hyaluronidase Papeln erzeugt. In einer i.v.-Dosis von 5 mg/kg an der Ratte und 30 mg/kg am Kaninchen sowie in einer oralen von 750 mg/kg am Kaninchen ließ sich eine signifikante Verminderung der erhöhten Kapillarpermeabilität erreichen. Bei unseren Versuchen am Katzenhinterlauf ließ sich das Etacrynsäureödem nach i.v.-Applikation von TMIC maximal um 73%, nach Ruscus-Extrakt um maximal 89% und nach Ruscogenin um maximal 70% hemmen. Kombiniert erzielten TMIC und Ruscus-Extrakt eine Ödemhemmung um maximal 100%.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung. Wie schon angedeutet, sprechen zahlreiche Befunde für einen mehrschichtigen Wirkmechanismus von Flavonoiden und Steroidglykosiden. Die offensichtliche Dosisabhängigkeit der Permeabilitätsreduzierung, besonders aber die dazu konträre Wirkung einer Permeabilitätserhöhung bei niedriger oder/und bei erhöhter Dosis, lassen vermuten, daß die Einzelmechanismen wie Permeabilitätserhöhung für

Flüssigkeit, für Proteine, Permeabilitätsreduzierung für Flüssigkeit, für Proteine, interstitieller Ödemabbau, Gefäßdilataion, Gefäßtonisierung jeweils unterschiedlich dosisabhängig sind. Auf der Stufe einer bestimmten Dosis resultiert aus der Summe der jeweiligen Einzeleffekte ein Gesamteffekt.

In der vorliegenden Versuchsanordnung ergaben sich so aus angenommenen Wirkmechanismen der Ödemsteigerung und denen der Ödemreduktion für Flüssigkeit und Proteine Gleichgewichte, die, abhängig von Dosis und Applikationsform, in ihrem Gesamtergebnis entweder näher bei Ödemsteigerung oder näher bei Ödemreduktion lagen. Es scheint deshalb möglich, unter jeweils definiertem Aspekt von einem Wirkungsmaximum einer Substanz zu sprechen.

- Abhängigkeit von Applikationsform. Für TMHC dürfte an Muskelgefäßen der Katze ein Wirkungsmaximum für Protein- und Flüssigkeitsreduktion im erzeugten Ödem bei einer i.v.-Dosis von 20 mg/kg liegen. An Hautgefäßen trat bei niedriger i.v.-Dosis von 10 mg/kg eine geringe Ödemsteigerung ein.

Anders bei oraler Applikation: Unter der erschwerten Voraussetzung der primär unbekannten Resorptionsquote von TMHC an der Katze konnte nur am Muskelgewebe ein verminderter Proteingehalt im Ödem mit steigender Dosis registriert werden. An Hautgewebe schien sich bei erhöhter Dosis die Ödemmenge zu steigern. Ebenso war beim Flüssigkeitsgehalt in Muskel- und Hautgewebe bei erhöhter Dosis die Tendenz zu einer Ödemvermehrung festzustellen.

Für Ruscus ergaben sich bei oraler Applikation ähnliche Resultate wie für TMHC oral.

Bei oraler Anwendung von Ruscogenin war in allen untersuchten Gewebeparametern eine verminderte Ödemreduktion oder gar eine Ödemsteigerung bei erhöhter Dosis zu registrieren.

Die nach intravenöser und peroraler Zufuhr unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Beziehungen können folgende Gründe haben:

1. die Wirkmechanismen sind bei i.v.- und bei oraler Gabe verschieden
2. durch die Tätigkeit der Darmflora und den first-pass-Effekt in der Leber werden Metaboliten mit anderem Wirkverhalten geschaffen
3. die Konzentration der Pharmaka nach oraler Applikation entspricht nicht der nach i.v.-Gabe, obwohl von einer 10%igen Resorption ausgegangen wurde.

ad 1.: Aus einem nach i.v.- und oraler Gabe von Diosmin unterschiedlichen

zeitlichen Bindungsverlauf an die tunica vascularis schließen Oustrin et al. (1977), daß nach oraler Gabe möglicherweise Metaboliten entstehen, die eine andere Affinität zur tunica vascularis besitzen.

Es ist deshalb durchaus denkbar, daß nach oraler Gabe von TMIC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin, metabolisch bedingt, andere Wirkmechanismen zutage treten.

ad 2.: Über einen, von der Struktur der Substanzen abhängigen Metabolismus der Flavonoide durch die Darmflora berichtet Griffiths (1973). Eine Veränderung der Primärstruktur sowie die Bildung von Metaboliten von TMIC sowie der Bestandteile des Ruscus-Extraktes ist somit möglich. Einen Einfluß des Leberstoffwechsels auf die Wirkungsweise von Diosmin konnten Oustrin et al. (1977) nachweisen. Förster, Ziege (1971) und Förster (1973) wiesen neben der intestinalen Resorption von Rutosiden auch Metaboliten nach, die ihrer Meinung nach in der Leber gebildet werden.

ad 3.: Siehe Punkt "Resorption"

Chanal et al. (1981) und Chanal et al. (1982) berichten sowohl über eine nachweisliche Resorption von TMIC als auch von Ruscus-Extrakt an der Ratte. Allgemein wird von einer ca. 10%igen Reabsorptionsquote ausgegangen (Felix 1976, 1980 a, 1980 b, 1982). Die Tatsache, daß bei Dosissteigerung schlechtere Wirkungen erzielt werden, läßt im Vergleich mit den Dosis-Wirkungs-Kurven der i.v.-Versuche auch daran denken, daß sich die gewählten oralen Dosierungen bereits im Bereich der Überdosis mit schlechterer Wirkung bewegen. Insofern läge hier der Verdacht auf eine höhere Resorptionsrate als 10% nahe.

Welche der angegebenen Punkte bei den angewandten Substanzen für die obige Beobachtung unterschiedlicher Wirkungen nach intravenöser und peroraler Zufuhr ausschlaggebend sind, ist ungewiß; jedoch sprechen neueste Befunde (Felix 1982 intern, Vortrag Ludwigsburg, Felix et al. 1983 a, b) für die Vorstellung unterschiedlicher Wirkmechanismen.

- Abhängigkeit der Wirkung von der Dosierung. Lecomte, Van Cauwenberge (1974) berichten, daß Mono-(O-beta-hydroxy-ethyl)-7-rutoside einen antiödematösen Effekt haben, bei schneller i.v.-Injektion und bei höherer Dosierung jedoch ein Ödem verstärken. Sie führen diese Permeabilitätssteigerung auf die Freisetzung von vasoaktiven Aminen zurück. Die Dosis, bei der ein antiödematöser Effekt beobachtet wurde, betrug 30 - 50 mg/kg i.v., 48, 24 und 2 Stunden vor Injektion der ödematogenen Substanzen Histamin, Bradykinin und

Carrageenin. Die ödemproduzierende Wirkung obiger Rutoside trat nach Injektion von 400 - 500 mg/kg i.v. auf.

Beim durch Hitze induzierten Ödem am Meerschweinchen war die Verzögerung der Ödementstehung durch TMHC ebenfalls dosisabhängig; es wurde allerdings bei 70 mg/kg die maximale Verzögerung erreicht, bei 100 mg/kg war die TMHC-Wirkung merklich geringer (Bohr et al. 1949). Van Cauwenberge, Franchimont (1968) stellen am Entzündungsmodell "Granulomtasche nach Selye" eine dosisabhängige Wirkung von Hydroxyethylrutosiden fest. In den intraperitoneal verabreichten Dosen 30, 100 und 2000 mg/kg konnte an Ratten keine Beeinflussung des Entzündungsgeschehens beobachtet werden. Dagegen erfolgt nach 500 mg/kg eine signifikante Abnahme der Entzündungszeichen Abszeß und granulomatöse Wandbildung.

Für Tri-(hydroxyethyl)-rutin konstatieren Casley-Smith et al. (1975) in hohen Dosen eine Endothelaffektion, ein Öffnen von Zellverbindungen, das vermutlich durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren bewirkt werde. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen über den Flavonoidmangel, daß sowohl ein Zuviel wie ein Zuwenig bestimmter Flavonoide Endothelschädigungen nach sich ziehe. Diese Meinung wird auch 1976 in einer Arbeit von Casley-Smith vertreten. Dabei wird der Schluß gezogen, daß die beobachtbare Endothelläsion und die ödemabbauende Wirkung gewisser Flavonoide nicht kausal zusammenhängen, sondern daß die Ödemreduktion trotz Endothelschädigung noch stattfinden kann. Beide seien voneinander unabhängige Mechanismen. Sie seien jeweils spezifisch für bestimmte Flavonoidderivate, für bestimmte Tierspezies und Gefäßabschnitte und sie seien dosisabhängig (Casley-Smith et al. 1975).

In Punkt "Wirkung auf Enzyme und Entzündungsmediatoren" (Einleitung) wurde auf eine Beeinflussung bestimmter Prostaglandine durch Flavonoide hingewiesen. Ganesan, Karim (1973, aus Gábor 1979) zeigten, daß Polyphloretinphosphat, ein Flavonoidderivat (Gábor 1979) in niedrigen Dosen die Wirkung von PGE_2 verstärke, in höherer Dosis aber vollkommen aufhebe. Abe et al. (1981) untersuchten membranstabilisierende Effekte von Saponinen aus *Bupleuri Radix* (= Saikosaponine) an Erythrozyten. Ihre Resultate zeigen, daß alle untersuchten Saikosaponine die Erythrozytenmembranen in niedrigen Dosen gegen Hämolyse durch Hitze und Hypotonie schützen.

In höheren Dosen aber verliere sich dieser Effekt zunehmend und gehe

in eine aktive Hämolysen durch Saikosaponine selbst über. Die Autoren sprechen von einem biphasischen Effekt der Saponine, der je nach Saponin spezifisch stark ausgebildet und konzentrationsabhängig sei. Der Übergang vom Punkt maximaler Membranstabilisierung zum Punkt der Membranlyse erfolge ziemlich abrupt, was sich in geringen Dosisunterschieden zwischen diesen beiden Effekten zeige.

Bei Untersuchungen mit Hydroxyethylrutosiden (HR) kommen Felix (1982 intern, Vortrag Ludwigsburg) und Felix et al. (1983 a, b) zum Schluß, daß nicht nur ein Unter-, sondern auch ein Überschreiten der maximalen Wirkstoffkonzentration zu einer schwächeren Wirkung führe. Die Befunde wurden an isolierten Gefäßen, an isolierten Ileum-Präparaten, sowie am Katzenhinterlauf erhoben.

Folglich müssen alle Aussagen über Wirksamkeit oder Unwirksamkeit derartiger Substanzen immer im Zusammenhang mit ihrer Dosierung gesehen werden. Dies gewinnt eine besondere Bedeutung, wenn es um Therapiestudien am Menschen geht. Denn aller Wahrscheinlichkeit nach liegen die Ursachen für eine mangelhafte Wirksamkeit von Flavonoiden und/oder Steroidglykosiden am Menschen unter anderem in einer mangelhaften Dosierung.

Unterschiedliche Wirkung in Haut- und Muskelgewebe

- Proteingehalt. Den Proteingehalt des reduzierten Ödems betrachtet, gilt für TMIC, daß nach i.v.-Applikation in Muskel- und Hautgewebe ein ödemprotektiver Effekt aufgetreten ist. Dieser war im Muskelgewebe deutlicher als im Hautgewebe. Bei oraler Applikation wurde der Proteingehalt nur im Muskelgewebe vermindert. An der Haut trat (vornehmlich bei erhöhter Dosis) keine ödemprotektive Wirkung von TMIC auf, d. h. der Proteingehalt des Ödems war nicht erniedrigt, sondern zum Teil erhöht.

Für Ruscus-Extrakt gilt nach i.v.-Gabe: Die Maximalwirkung bei Reduzierung des Ödemproteins war in der Haut prozentual größer als im Muskelgewebe. Oral gegeben wirkte Ruscus nur am Muskel ödemhemmend, an der Haut hingegen eher ödemsteigernd.

Gleiche Verhältnisse trafen auch für die i.v.-Gabe von Ruscogenin zu. In Muskel- und Hautgewebe war der Proteingehalt des Ödems vermindert, in der Haut stärker als im Muskel.

Ruscogenin, oral verabreicht, wirkte in beiden Geweben zunächst ödem-

protektiv. Bei erhöhter Dosis war jedoch ein schwächerer Effekt zu verzeichnen. Dies führte im Hautgewebe zu einer mehr ödematösen Wirkung.

Kombination: Die i.v.-Kombination von TMHC und Ruscus reduzierte den Proteingehalt des Ödems an der Haut nahezu vollkommen, am Muskel weniger stark. Oral angewandt wirkten die Kombinationen in Muskel- und Hautgewebe nahezu gleich stark ödenhemmend.

- Flüssigkeitsgehalt. Was den Flüssigkeitsgehalt des erzeugten Ödems betrifft, so gilt für TMHC, Ruscus und Ruscogenin nach i.v.-Gabe in allen angewandten Dosierungen gleichermaßen, daß der Flüssigkeitsaustritt im Muskelgewebe stärker zu hemmen war als im Hautgewebe.

Die TMHC-Ruscus-Kombinationen lagen ebenfalls in der Flüssigkeitshemmung am Muskelgewebe besser als am Hautgewebe, wenngleich der Unterschied gering war.

TMHC, Ruscus und Ruscogenin verminderten nach oraler Applikation den Flüssigkeitsgehalt des Ödems kaum. In höheren Dosen wurde eher eine permeabilitätsfördernde Wirkung vermerkt, besonders an Hautgefäßen.

Eine Ausnahme machten in dieser Beziehung die oralen Kombinationen aus TMHC und Ruscus: Sie wirkten nicht ödematogen. Wiederum war die Flüssigkeitsreduktion am Muskel deutlicher als an der Haut.

Diese an Haut- und Muskelgewebe unterschiedliche Wirkung könnte folgende Ursachen haben:

1. Durch die Etacrynsäure wurden Haut- und Muskelgefäße unterschiedlich stark geschädigt.
2. Die jeweiligen Pharmaka gelangten in unterschiedlichen Konzentrationen an Haut- und Muskelgefäße.
3. Ausgelöst durch eine gefäßtonisierende Wirkung der Pharmaka fand eine Umverteilung des Blutes zugunsten eines Gewebeteils, der Haut oder der Muskulatur statt.
4. Die Wirkung der Pharmaka war jeweils an Haut- und Muskelgewebe unterschiedlich stark bei gleichen Wirkungsmechanismen oder es existierten gewebespezifische Wirkmechanismen.

ad 1.: Hält man sich die Kontrollwerte vor Augen und sieht man darin direkt die Etacrynsäurewirkung repräsentiert, so muß man aus den unterschiedlichen Ödemwerten zwischen Muskelgewebe und Haut schließen, daß Muskelgefäße und Hautgefäße unterschiedlich stark durch die Etacrynsäure geschädigt wurden. Dies findet im Proteingehalt des erzeugten Ödems besondere Bestätigung, da dieser im Muskel-

gewebe mehr als 5 mal so hoch war wie im Hautgewebe. Von der Etacrynsäure ist eine selektiv gefäßtonisierende Wirkung mit nachfolgender Umverteilung der gewebeanteiligen Perfusionsmenge, was zu einer einseitig erhöhten Filtration von Eiweiß und Flüssigkeit führen würde, nicht bekannt. In diesem Zusammenhang dürfte die unterschiedliche physiologische Funktion der Haut bei Katze und Mensch von Wichtigkeit sein. Zum Schutz gegen Wärmeverluste besitzt die Katze einen dichten Haarbesatz. Abgabe von Wärme über Verdunstung jedoch ist bei ihr nicht über die Haut möglich (Scheunert, Trautmann 1976), da sie keine ekkrinen Schweißdrüsen besitzt (Nickel et al. 1976). Folglich spielt die Haut der Katze bei Regulierung der Körpertemperatur eine weit weniger wichtige Rolle als bei Primaten. Bei diesen nämlich besitzt die Haut durch die Funktion des Schwitzens und eine über mehrere Größenordnungen variable Blutperfusion eine große Kapazität der Wärmeregulierung. Deshalb ist bei der Katze die Haut weniger vaskularisiert und auch die Blutperfusion weniger variabel.

Über die höhere Gefäßdichte pro 100 g Gewebe und die höhere Durchblutung pro Minute und 100 g Gewebe ist die Einwirkfläche und -zeit der Etacrynsäure im Muskelgewebe bedeutend größer als in der Haut. Dies mag das Zustandekommen der unterschiedlichen Ödemwerte an Haut und Muskulatur bei Kontrollen erklären. Die Schädigung durch Etacrynsäure ist somit an diesen Geweben insgesamt quantitativ verschieden.

Diese Einflüsse haben aber keine Bedeutung beim rechnerischen Vergleich der antiödematösen Wirkung der Pharmaka an Haut- und Muskelgewebe, da hierzu die relative, prozentuale Ödemhemmung, bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert, herangezogen wurde (siehe Ergebnisse).

ad 2.: Für eine ungleiche perfusionsbedingte Verteilung der Pharmaka zwischen Haut und Muskulatur gibt es keinen Anhaltspunkt.

ad 3.: Bei i.v.-Injektion konnte zwar weder bei TMIC noch bei Ruscus-Extrakt oder bei Ruscogenin eine Gefäßwirkung nachgewiesen werden. Jedoch bezieht sich diese Beobachtung auf die Gesamtheit der Extremitätsperfusion, nicht auf die jeweilige des Haut- und Muskelgewebes. Umverteilungsvorgänge konnten mit der vorliegenden Methodik nicht registriert werden, zumindest nicht als solche. Jedoch sind bei Flavonoiden allgemein und auch bei TMIC Eigenschaften bekannt, die über gefäßaktive Mechanismen eine Perfusionsänderung denkbar erscheinen

lassen. Ebenso sind für Ruscus-Extrakt und Ruscogenin derartige Mechanismen beschrieben. Möglich wäre, daß diese Effekte in Haut und Muskulatur unterschiedlich sind und somit eine gewisse Umverteilung der Perfusion eintreten könnte (Felix 1978).

ad 4.: Für gewebespezifische Mechanismen der einzelnen Pharmaka sprechen Befunde, wonach TMIC i. v. am Muskel eine deutlichere Proteinminderung als an der Haut bewirkte, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin hingegen an der Haut eine viel stärkere Proteinhemmung als am Muskel hervorriefen. Diese Vorstellung wird durch die Ergebnisse nach kombinierter Anwendung von TMIC und Ruscus-Extrakt, i. v., gestützt:

Durch den Ruscus-Anteil des Gemisches wurde ebenfalls an der Haut eine weitaus stärkere Proteinreduktion als am Muskel erreicht.

Felix (1978) berichtete über seine Beobachtung, daß Hydroxyethylrutoside, an der Katze in der auch hier beschriebenen Methodik intravenös angewandt, in der Haut eine stärkere Wirkung hatten. Die ödematogenen Substanzen, deren Wirkung zu hemmen war, waren Ethoxysklerol und Thio-pental. Oustrin et al. (1977) zeigten in ihrer Arbeit auf, daß Diosmin in unterschiedlichem Ausmaß an die verschiedenen Gewebe, Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Arterie und Vene gebunden ist. Daraus könnte man den Schluß ziehen, daß diese und ähnliche Substanzen eine gewebespezifische Affinität möglicherweise auch hinsichtlich ihrer Wirkmechanismen haben.

Unterschiedliche Wirkung auf Wasser- und Proteinaustritt

Die Hemmung des Flüssigkeitsgehaltes im erzeugten Ödem war bei der i.v.-Gabe von TMIC, Ruscus, Ruscogenin und von TMIC und Ruscus in Kombination durchschnittlich etwa halb so groß wie die prozentuale Hemmung des Proteingehaltes. Dies traf auf Muskel- und Hautgewebe gleichermaßen zu. Felix (1978) äußerte die Vermutung, daß Wasser- und Eiweißödem nicht parallel entstehen müssen.

Daß die Hemmung des Flüssigkeitsödems durchaus schwächer war als die des Proteinödems, mag folgende Gründe haben:

- bei Schädigung werden die Mikrogefäße zuerst für niedrigmolekulare Flüssigkeit und dann erst für Proteine durchlässig (Felix 1978).

Eine eventuelle Membranwirkung der Pharmaka kann möglicherweise zwar die Proteinpermeabilität reduzieren, nicht aber die schon bei sehr geringen Membranstörungen bereits mögliche Flüssigkeitspermeabilität.

- Dafür spricht auch die Erfahrung, daß bei oraler Applikation obiger Pharmaka die beobachtete Permeabilitätssteigerung für Flüssigkeit bei geringeren Dosen einsetzte und ausgeprägter war als die für Pro-

tein. Dies traf für Haut- und Muskelgewebe zu (Abb. 24, 26).

- Nimmt man als Wirkprinzip der Flavonoide und Steroidglykoside die von Casley-Smith u. a. (siehe Einleitung: Wirkungsmechanismen) postulierte Ödemreduzierung durch interstitielle Proteolyse zur Grundlage, so gilt, daß die Ödemflüssigkeit indirekt, d. h. durch "Entfernen" der osmotisch wirksamen Proteine aus dem Interstitium, abgebaut wird. Diese Phasenverschiebung zwischen Protein- und Flüssigkeitsreduzierung könnte ein Nachhinken des Flüssigkeitsödems als eine geringere Wirkung der Pharmaka erscheinen lassen.
- Zum anderen wiesen Casley-Smith, Piller (1973) und Casley-Smith (1976) nach, daß Flavonoide spezifisch die Permeabilität der Mikrogefäße erhöhen können. Die Vorstellung, daß im Falle des TMIC und der Steroidglykoside eine möglicherweise erhöhte Flüssigkeitspermeabilität eine geringere ödemreduzierende Wirkung vorgab, ist möglich. Nach Földi, Casley-Smith (1978) ist die Permeabilitätserhöhung aber unbedeutend im Vergleich zum Effekt der Ödemreduktion durch die massiv gesteigerte Proteolyse der Makrophagen.

4.5 Kombination von Flavonoiden und Saponinen

TMIC. Eine Kombinierung mehrerer Flavonoide oder von Flavonoiden mit Steroidsaponinen wurde vorgenommen, um über die Summation mehrerer Wirkungen ein breiteres Wirkungsspektrum zu bekommen. Die Vorstellungen gingen davon aus, die mehr membran- bzw. endothelgerichteten Effekte des TMIC mit mehr vasculotropen Effekten des *Ruscus-aculeatus*-Extraktes zu verbinden.

Die Membranwirkung des TMIC und sein permeabilitätssenkender Effekt wird von mehreren Autoren beschrieben (Bohr 1949, Gábor et al. 1968, 1970, 1972, 1979, Böhm 1967, Seidenberger et al. 1974, Tarayre, Laressergues 1975, 1977, Merlen, Coget 1975, Rudofsky, Nobbe 1982).

Ruscus-aculeatus-Extrakt. Für *Ruscus-aculeatus*-Extrakt wird besonders auf eine Verminderung der Venenkapazität und auf eine Venentonisierung verwiesen, die in unseren Versuchen nicht bestätigt werden konnte (3.3.2). (Moscarella 1953, Caujolle et al. 1953, Seidenberger et al. 1974, Tarayre, Laressergues 1976, 1979, Coget, Merlen 1980, Rudofsky, Nobbe 1982).

Eine Kombination von TMIC mit *Ruscus-aculeatus*-Extrakt und anderen Stoffen wurde in den letzten Jahren von folgenden Autoren vorgenommen:

Laouressergues (1970, Fa. Lipha intern), Tarayre, Laouressergues (1976), Tarayre, Laouressergues (1979), Coget, Merlen (1980), Chanal (1981), Rudofsky, Nobbe (1982), Senton (1983), Coget (1983), Laouressergues, Vilain (1983), Thebault, Blatrix (1983), Thebault (1983). Aus diesem Grund und nicht zuletzt wegen des zunehmenden, unter der Bezeichnung Venermittel geführten Medikamentenangebotes, das diese Kombination enthält, wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Kombinationsverhältnissen von TMIC und Ruscus-aculeatus-Extrakt durchgeführt. Beim Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehung zweier Pharmaka ergibt sich nach Forth et al. (1980) im Falle verschiedener Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurven, daß ein einfacher Vergleich über den gesamten Dosisbereich nicht möglich ist. Da Dosis und Effekt nicht linear korreliert seien, sondern in der bekannten logarithmischen Abhängigkeit, bestünden unterschiedliche Maßsysteme: Eine Verdoppelung der Dosis habe unterhalb des 50%-Niveaus der Wirkungskurve meist mehr, oberhalb davon weniger als eine Verdoppelung der Wirkung zur Folge. Deshalb sei es nötig (Forth et al. 1980) beim Vergleich zweier (oder mehrerer) Stoffe in Kombination Wirkungs- bzw. Dosisäquivalente heranzuziehen.

Um also Aussagen über mögliche synergistische Beziehungen der kombinierten TMIC und Ruscus-Extrakt machen zu können, wird die prozentuale Wirkung der Einzelsubstanzen mit der der zugehörigen Kombination verglichen. Ein additiver Effekt lag vor, wenn die Kombination die Wirkung beider Einzelsubstanzen in zugehöriger Dosierung übertraf.

Kombination, intravenöse Anwendung. Aus der Zusammenfassung der Ergebnisse (3.4) ist zu entnehmen, daß nach i.v.-Applikation der TMIC/Ruscus-Kombinationen in 7 von 12 Dosisgruppen synergistische Effekte aufgetreten waren. Diese beziehen sich sowohl auf den Protein- wie auf den Flüssigkeitsgehalt im Ödem. Weiter ist zu erwähnen, daß die Kombinationen an der Haut im Wirkungsmaximum die Einzelkomponenten übertrafen. Die 10/20-Kombination konnte hier das Proteinödem sogar völlig unterdrücken, was mit TMIC und Ruscus einzeln in keiner der angewandten Dosierungen gelang.

Wird speziell TMIC betrachtet, so fällt die relativ schwache ödemprotektive Wirkung an der Haut auf. Durch Hinzunahme der deutlich stärker ödemhemmenden Potenz von Ruscus im Hautgewebe erreichte man kombiniert sogar additive Verstärkung. Diese trat sowohl bei Reduktion des Protein- wie des Flüssigkeitsgehaltes im Ödem auf. Dabei

war das Flüssigkeitsödem der Haut um 48% signifikant zu hemmen, ein Wert, der mit Einzelkomponenten nicht zu erzielen war.

Nach Gewebe getrennt, schien TMHC mehr im Muskel, Ruscus hingegen besonders in der Haut ödemprotektiv zu wirken. Kombiniert bestätigte sich der günstige Einfluß auf das Ödem im Muskel, wobei überwiegend synergistische Verstärkung der ödemprotektiven Wirkung nachzuweisen war.

Im Hautgewebe war die Wirkung der Kombinationen nahezu ideal: Das Proteinödem war völlig zu hemmen, der Flüssigkeitsgehalt im Ödem um fast 50%.

Venentonisierung. Hinsichtlich einer primär für Ruscus geforderten Venentonisierung müssen nach den Ergebnissen für Ruscus einzeln auch die Kombinationen enttäuschen: Ein Effekt auf das kapazitive System der Beinvenen konnte weder nach intravenöser noch nach oraler Verabreichung bestätigt werden.

Rudofsky, Nobbe (1982) kommen mit ihrer Zusammensetzung der Kombination, 750 mg TMHC, 750 mg Ruscus und 500 mg Ascorbinsäure, der hier angewandten noch am nächsten. In ihrer Arbeit beschreiben sie die Auswirkungen auf die stauungsplethysmographisch am Menschen gemessene Venenkapazität und Venenentleerungsgeschwindigkeit des Beines; Ruscus führte eindeutig zu Verringerung der Venenkapazität, TMHC nur bei einem Teil der Probanden; bei einem anderen Teil kam es zu einem Anstieg der venösen Kapazität. Die Kombination aus beiden Substanzen ergab keine eindeutig synergistische Wirkungsverstärkung. Sie spiegelte auch die unterschiedliche TMHC-Reaktion wider und führte bei diesem Teil der Versuchspersonen zur signifikanten Kapazitätssteigerung.

Kombination, orale Anwendung. Die orale Anwendung der Kombination (Ergebnisse 3.6) übertraf an Muskel- und ganz besonders an Hautgewebe die Resultate der Einzelsubstanzen: An der Haut ergab sich in beiden Ödemformen und am Muskel beim Flüssigkeitsödem nach kombinierter Anwendung eine deutlichere Ödemhemmung. Dies war nicht zuletzt dadurch möglich, daß TMHC und Ruscus-Extrakt als Einzelsubstanzen Haut- und Muskelödem zum Teil verstärkten.

Sowohl in der Wirkung auf das Ödem im Muskel wie auf das in der Haut können additive Effekte angenommen werden. Dies bedeutet, daß nach oraler Zufuhr von TMHC und Ruscus die synergistische Verstärkung der ödemprotektiven Wirkung stärker ins Gewicht fällt als nach intravenöser Gabe. Die mäßige Wirkung der Einzelsubstanzen konnte in allen

Fällen bedeutend gesteigert werden.

Ein Weg, die besondere Wirkung der oralen Kombination zu erklären, führt nach Chanal et al. (1981) zur Frage der intestinalen Resorption. Chanal et al. verglichen die Plasmaspiegel der Einzelsubstanzen TMHC und Ruscus-Extrakt mit denen nach kombinierter Gabe. Die orale Kombination aus TMHC, Ruscus-Extrakt, Ascorbinsäure und Esculetol führte, diesen Untersuchungen zufolge, zu höheren Blutspiegeln. Möglicherweise ist diese Differenz entscheidend für die Wirkunterschiede, die an der Katze zutage traten.

Die bekannte grenzflächenaktive Wirkung der Saponine könnte durch intestinale Epithelreizung oder durch Interaktion mit Stoffwechselprozessen eine forcierte Resorption beider Komponenten nach sich ziehen.

Den hier vorliegenden Resultaten folgend, müßte jedoch eine Dosissteigerung eher zu einer Permeabilitätssteigerung führen: Wurden die Einzelkomponenten oral verabreicht, nahm die positive Wirkung der Ödemhemmung mit steigender Dosis ab. Dies hätte auch eintreten müssen, wenn diese Dosen gleichzeitig (in Kombination) gegeben wurden. Eine Erklärung der Wirkung der Kombination über höhere Substratspiegel scheint deshalb nicht einleuchtend.

Daß durch metabolische Einflüsse nach Kombination andere denkbare Metaboliten entstehen wie nach Gabe der Einzelkomponenten, ist unwahrscheinlich.

Mit einer ähnlichen Kombination aus Flavonoiden, TMHC und Methyl-4-esculetol, Ruscus-Extrakt und Ascorbinsäure erzielten Tarayre, Lauressergues (1976) nach oraler Anwendung günstige Effekte auf die Hyperämie durch Nicotinsäure am Kaninchenohr, auf die erhöhte Kapillarpermeabilität nach Histamin, Serotonin, Bradykinin, 48/80 und Polymixine an der Ratte, auf das UV-Erythem am Albinokaninchen und auf Dextran- und Carrageeninödem an der Rattenpfote. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich, wenn die Kombination noch durch ein Chymotrypsin-Trypsin-Gemisch erweitert wurde (Tarayre, Lauressergues 1977 und 1979). Die Ödemreduktion war auch signifikant, wenn die Kombination 30 min nach Ödemereizung intraduodenal verabreicht worden war. Dieser als kurativ bezeichnete Effekt wurde von diesen Autoren mit einer positiven Pharmakonwirkung auf den Lymphtransport erklärt.

4.6 Ruscus-aculeatus-Extrakt im Vergleich mit Ruscogenin

Ruscogenin ist eines der Steroidsapogenine, das im Ruscus-Extrakt enthalten ist und von Lapin und Sannie 1955 isoliert und charakterisiert wurde. Da als Inhaltsstoffe des Extraktes noch weitere Sapogenine, Prosapogenine, Zuckerarten, ätherische Öle, Harze, Tannin, Phytosterol und Pyrocatechol genannt werden (Seidenberger et al. 1974), bietet sich ein Vergleich einiger pharmakologischer Gesichtspunkte zwischen Ruscogenin und dem Extrakt an. Da Ruscogenin als Hauptwirkstoff des Extraktes angesehen wird (Seidenberger et al. 1974), wurde zunächst versucht, Ruscogenin in einer Dosis zu verwenden, die seiner errechneten Menge im Extrakt entsprochen hätte. Um aber eine signifikante und eine dem Ruscus-Extrakt vergleichbare Wirkung zu erhalten, mußte Ruscogenin allein in der 10-fachen Menge i. v. gegeben werden. Ruscogenin wirkte wie der Extrakt an Haut- und Muskelgewebe ödemhemmend und verminderte sowohl die Protein- als auch die Flüssigkeitspermeabilität. Hinsichtlich der erforderlichen Dosis für Ruscogenin kann angenommen werden, daß im Ruscus-Extrakt bei intravenöser Applikation noch andere Inhaltsstoffe in gleicher Weise wirksam waren wie Ruscogenin.

Gewebespezifische Wirkung. In der gewebespezifischen, an Haut- und Muskelgewebe unterschiedlich starken Wirkung glichen sich Ruscus-Extrakt und Ruscogenin: Beide wirkten an der Haut prozentual stärker ödemhemmend als am Muskel. Die Flüssigkeitshemmung war jeweils am Muskelgewebe stärker.

Wirkung auf Kreislauf. Während weder bei Ruscogenin als Einzelsubstanz noch bei Ruscus-Extrakt eine Beeinflussung der Venenkapazität des Beines nachweisbar war, ergab sich bei der Reaktion des arteriellen Mitteldrucks ein Unterschied: Ruscogenin zog bei i.v.-Injektion keine depressorische Reaktion des Blutdruckes nach sich. Das würde bedeuten, daß andere Stoffe im Ruscus-Extrakt für diese Kreislaufwirkung verantwortlich waren; oder aber, daß Ruscogenin in der niedrigen Konzentration im Extrakt eine mögliche kardiodepressive Wirkung besitzt, nicht aber in der hohen Konzentration nach Gabe von 4 mg/kg.

Orale Applikation. In der Dosis-Wirkungs-Beziehung folgte Ruscogenin der in Punkt 3.5.3 beschriebenen Tendenz einer geringeren Wirkung nach Dosissteigerung. Dies ist mit dem Verhalten des Ruscus-Extraktes bei

oralen Dosierung von 200 und 400 mg/kg zu vergleichen. Allerdings schien bei oraler Gabe von Ruscogenin eher zuzutreffen, daß Ruscogenin Hauptwirkungssträger des Extraktes ist. Die Resultate mit Ruscus-Extrakt blieben hinter denen mit Ruscogenin zum Teil zurück (Abb. 24). Möglich ist, daß die Komponenten des Ruscus-Extraktes in ihrem Resorptionsverhalten unterschiedlich sind, so daß nach oraler Zufuhr das Dosis-Wirkungs-Verhalten des Ruscus-Extraktes eher dem des Ruscogenin gleicht. Auf der anderen Seite kämen nach dieser Vorstellung die anderen Inhaltsstoffe des Extraktes bei oraler Gabe weniger zur Wirkung als nach i.v.-Gabe.

4.7 Resorption von Flavonoiden und Saponinen

Die Frage der Resorption von Flavonoiden und Saponinen ist bisher nicht eindeutig beantwortet (Hofmeister 1970, Förster, Ziege 1971, Förster 1978), jedoch lassen in neuerer Zeit einige Autoren keine Zweifel an einer nachweisbaren Resorption von Bioflavonoiden, auch von TMHC (Chanal et al. 1981).

Für Ruscus-Extrakt wurde an Ratten eine Resorption nachgewiesen (Chanal et al. 1982). Aus den Ergebnissen der Protein- und Flüssigkeitswerte im Etacrynsäureödem am Hinterlauf der Katze läßt sich folgern, daß TMHC, Ruscus und Ruscogenin ausreichend resorbiert werden können. Da Ruscogenin und einige Bestandteile des Ruscus-Extraktes (u. a. Saponine) sehr schlecht wasserlöslich sind, TMHC hingegen ausgesprochen gut wasserlöslich und praktisch nicht fettlöslich ist, kann für diese beiden Substanzgruppen ein unterschiedlicher Resorptionsmechanismus gefordert werden.

Für TMHC wie für andere Stoffe mit einem mittleren Molekulargewicht von über 400 und einer schlechten Fettlöslichkeit besteht theoretisch keine Möglichkeit, daß für eine ödemprotektive Wirkung ausreichende Mengen von ca. 10 mg/kg in den großen Kreislauf gelangen: Die Mucosa stellt für gut wasserlösliche und fettunlösliche Substanzen eine nahezu unüberwindbare Barriere dar. Außerdem gehen Substanzen mit einem Molekulargewicht von über 400 weitgehend in den enterohepatischen Kreislauf. Gelangen dennoch geringe Mengen solcher Substanzen in den großen Kreislauf, werden sie rasch von den Nieren ausgeschieden (Felix 1982, intern, Felix et al. 1983 a).

Die Resultate der Ödemreduzierung nach oraler TMHC-Gabe widersprechen

dieser Betrachtung über die Möglichkeiten der Resorption dieses Stoffes. Aus unseren Ergebnissen kann eine Resorptionsquote von ca. 10% abgeleitet werden. In dieser Größenordnung liegen auch Angaben anderer Autoren (Felix 1976, 1980). Chanal et al. (1981) haben an Ratten die Resorption und die Ausscheidung von ^{14}C TMHC untersucht. Nach oraler Applikation wurde ein biphasischer Anstieg der Radioaktivitätsspiegel im Blut mit einem Maximum nach 1 - 2 Std. und einem zweiten Maximum nach 8 Std. beobachtet. Hieraus ergeben sich Hinweise auf einen enterohepatischen Kreislauf, durch den die Ausscheidung verzögert wird. Den Beweis für eine biliäre Sekretion lieferte in der gleichen Arbeit die Beobachtung, daß bei i.v.-Applikation von TMHC nach 24 Stunden über die Faeces etwa die gleiche Menge wie renal ausgeschieden wird.

Untersuchungen zu Resorption und Elimination von Ruscus-Extrakt wurden ebenfalls von Chanal et al. (1982) angestellt. Es wird über eine starke biliäre Elimination von Ruscus berichtet, sowie die Existenz eines enterohepatischen Kreislaufes nachgewiesen, bei dem nach i.v.-Gabe von Ruscus-Extrakt 1/3 der Gesamtausscheidung über die Faeces abläuft. Ein hoher Blutspiegel nach oraler Gabe mit einem Maximum nach etwa 2 Stunden und nahezu konstantem Spiegel über 24 Std. sind Hinweise auf gute Resorption und verzögerte Ausscheidung von Ruscus-Extrakt.

Aus den Ergebnissen der Ödemminderung nach oraler Gabe von 200 bzw. 400 mg/kg Ruscus kann zum einen auf eine Resorption dieses Stoffgemisches geschlossen werden. Zum anderen kann aus dem Vergleich mit den Resultaten nach intravenöser Verabreichung eine Resorptionsquote von 5 - 10% abgeleitet werden.

Für Ruscogenin, ein Saponin aus dem Ruscus-Extrakt, können aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der Ödemhemmung ähnliche Aussagen gemacht werden. Der Vergleich der Resultate nach intravenöser Gabe mit denen nach oraler läßt den Schluß auf eine etwa 20%ige Resorptionsquote zu. Somit dürfte Ruscogenin in dieser Hinsicht den beiden anderen Substanzen bzw. Substanzgemischen überlegen sein.

Aus Analysen der Ödementwicklung während der Versuchszeit ergaben sich Unterschiede in der Pharmakonwirkung in Abhängigkeit von der Applikationsform. Intravenös verabreicht führten sie zu einer, verglichen mit oralen Versuchen, stärkeren Ödemhemmung. Die Ausbildung des Etacrynsäureödems wurde vor allem zu Beginn der Perfusion, also etwa 55 bis 90 Minuten nach Applikation der Pharmaka wirksam verhindert. Dann ließ dieser Effekt allmählich nach, die Filtration/min stieg an.

Nach oraler Anwendung war der ödemhemmende Einfluß zwar meßbar, aber

vergleichsweise gering. Ein weiterer Unterschied bestand darin, daß sich die Wirkung nicht hauptsächlich zu Beginn des Versuches abspielte und dann nachließ, sondern über die Zeit konstanter war als nach i.v.-Gabe. Daraus läßt sich ein Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik und Wirkung der Pharmaka ableiten. Dem entspricht die hohe, akute, aber relativ kurzzeitige ödemprotektive Potenz der Pharmaka nach i.v.-Applikation. Von TMC und Ruscus-Extrakt ist nämlich eine kurze Plasmahalbwertszeit von 1/2 - 2 Stunden bekannt (Chanal et al. 1981, Chanal et al. 1982). Die konstantere, aber schwächere Wirkung der oralen Applikation korreliert mit dem Nachweis einer geringen enteralen Resorption, einer längeren Halbwertszeit von 12 - 20 Stunden und dem Hinweis auf einen enterohepatischen Kreislauf. Folglich kann man von einer oralen Applikation einen länger anhaltenden ödemprotektiven Effekt erwarten und muß bestrebt sein, durch geeignete Dosierung die geringe Resorptionsquote auszugleichen. Eine Möglichkeit bietet die hohe Einzeldosierung von, wie in unserem Fall, ca. 200 - 500 mg/kg.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch mehrmalige orale Applikation bei einem der Halbwertszeit entsprechenden Dosierungsintervall eine Erhaltungsdosis zu erreichen. Dies wurde von Felix et al. (1983 a), Felix (1984) und Schmidt (1984, Dissertation in Anfertigung) mit O-(beta-Hydroxyethyl)-rutosiden durchgeführt: Mit vergleichsweise geringen Dosen (20 mg/kg und Tag, oral) über 4 Tage wurden ödemprotektive Effekte erzielt, die denen nach hoher Einmaldosis (200 mg/kg oral) überlegen waren. Daraus ergeben sich günstige Aspekte für die Therapie beim Menschen, denn eine ähnlich hohe Dosis von 10 - 30 g/Tag (bei 70 kg Körpergewicht) nicht zugemutet werden muß. Eine vergleichsweise niedrige Erhaltungsdosis von 0,5 - 2 g/Tag würde demnach genügen, um die niedrige Resorptionsquote auch beim Menschen wettzumachen.

Im Tierversuch erzeugt man innerhalb kurzer Zeit eine massive Endothelschädigung, die zu einem eiweißreichen Ödem führt. Es liegt auf der Hand, daß eine derart aggressive Schädigung nur durch hohe Dosen ödemprotektiver Substanzen zu unterbinden ist. Bei der chronischen Veneninsuffizienz des Menschen ziehen sich die schädigenden Vorgänge über einen längeren Zeitraum hin und sind weniger aggressiv, so daß hier möglicherweise weniger hohe Dosen ausreichen (Felix 1983, 1984).

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Am Hinterlauf der narkotisierten Katze wurde durch das Diuretikum Etacrynsäure in Muskulatur und Haut ein eiweißreiches Ödem erzeugt. Die Etacrynsäure rief dieses Ödem nicht über einen entzündlichen Prozeß, sondern durch direkte Endothelschädigung hervor. Zu diesem Zweck wurde sie intraarteriell appliziert und wirkte 10 min lang ein. Pharmaka, denen eine unspezifische ödemprotektive Wirkung zugesprochen wird, sollten die Ausbildung dieses Ödems verhindern bzw. abschwächen. Trimethylhesperidinalcon (= TMHC), Ruscus-aculeatus-Extrakt oder Ruscogenin wurden deshalb 45 Minuten vor Endothelschädigung intravenös verabreicht. Bei oraler Zufuhr der Pharmaka geschah dies mittels einer Schlundsonde etwa 4 Stunden vor dieser Schädigung.

Mit der isolierten arteriellen und venösen Perfusion der Katzenextremität wurden der transkapilläre Flüssigkeitsaustausch sowie Einflüsse der Pharmaka auf Kreislaufparameter erfaßt. Beobachtet wurden der Blutdruck des Tieres, das venöse Blutvolumen der Extremität und der arterielle Perfusionsdruck.

Nach intravenöser Injektion von TMHC und Ruscus-Extrakt konnte kurzzeitig ein dosisabhängiger Abfall des Blutdrucks registriert werden, jedoch nicht nach Injektion von Ruscogenin. Ein Einfluß der i.v.-injizierten Pharmaka auf das Venenvolumen, eine tonisierende oder dilatierende Wirkung war nicht zu beobachten. Ebensowenig ließ sich der periphere Widerstand akut beeinflussen. Allerdings wurde der langsame Anstieg des Perfusionsdruckes über 45 Minuten durch TMHC und Ruscus-Extrakt signifikant gedämpft, Ruscogenin zeigte diesen Effekt nicht.

TMHC und Ruscus-Extrakt erzielten kombiniert ähnliche Einflüsse auf die Kreislaufparameter wie als Einzelsubstanzen. Insbesondere war keine Venentonisierung nachzuweisen.

Nach oraler Applikation der Pharmaka trat ebenfalls eine signifikante Minderung des peripheren Widerstandes während der 45minütigen Perfusion ein. Diesmal war auch nach oraler Ruscogeningabe ein derartiges Ergebnis zu registrieren.

Zur Beurteilung der ödemprotektiven Potenz der Pharmaka wurde nach einer bestimmten konstanten Zeit in Haut- und Muskelgewebe gesondert der Gehalt an markiertem Plasmaprotein und an Flüssigkeit bestimmt.

TMHC, Ruscus-Extrakt und Ruscogenin hemmten nach intravenöser und oraler Gabe die Ausbildung des Ödems statistisch signifikant und dosisabhängig. Auffällig dabei war, daß nach Überschreiten

der optimalen Dosis die ödemprotektive Wirkung wieder schwächer wurde. In einigen Fällen war dabei, besonders nach oraler Applikation, ein ödematöser Einfluß dieser Pharmaka zu erkennen. Ruscus-Extrakt und Ruscogenin zeigten einen bevorzugten Einfluß auf das Hautödem, die Wirkung des TMIC setzte primär beim Muskelödem an.

Es ist anzunehmen, daß im Gesamtextrakt aus *Ruscus aculeatus* neben Ruscogenin noch andere Substanzen ödemprotektiv wirksam sind.

Mit der Kombination aus TMIC und Ruscus-Extrakt ließen sich die günstigen ödemprotektiven Effekte der Einzelsubstanzen wiederholen. Zum Teil zeigte sich ein additiver Synergismus der Pharmaka, vor allem nach oraler Verabreichung. Die Wirkprävalenzen von TMIC auf Muskelgewebe und von Ruscus auf Hautgewebe kamen als umfassende ödemhemmende Gesamtwirkung zum Ausdruck.

Aus den Ergebnissen nach oraler Applikation ließ sich für TMIC und Ruscus eine Resorptionsquote von ungefähr 10% annehmen. Bei Ruscogenin dürfte sie etwa 15 - 20% betragen haben.

Aus der Analyse der Ödementwicklung konnte abgeleitet werden, daß intravenös verabreichte Pharmaka vor allem den schnellen Einstrom von Flüssigkeit und Eiweiß ins Interstitium direkt im Anschluß an die Schädigungsphase wirksam verhindern können. Gegen Ende der Zeit allerdings ließ diese Wirkung deutlich nach, was wir auf die kurze Plasmahalbwertszeit zurückführten.

Anders nach oraler Applikation: Die Wirkung auf die Ödembildung war schwächer, war aber gleichmäßiger über den Versuchszeitraum verteilt. Dies korreliert mit der längeren Plasmahalbwertszeit bei oraler Zufuhr der Pharmaka.

Für die einmalige Applikation zur Erzeugung des ödemprotektiven Effektes waren i. v. wie oral sehr hohe Dosen notwendig. Bei chronischer Zufuhr genügten wahrscheinlich geringere Dosen.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Abe, H., M. Sakaguchi, M. Anno, S. Arichi
Erythrocyte membrane stabilization by plant saponins
and sapogenins
Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316,
262 - 5 (1981)
2. Abdel-Sayed, W. A., F. M. Abond, M. G. Calvelo
Effect of local cooling on responsiveness of muscular
and cutaneous arteries and veins
Am. J. Physiol. 219, 1772 - 1778 (1970)
3. Balis, G. U., R. R. Monroe
The pharmacology of chloralose, review
Psychopharmacologia 6, 1 - 30 (1964)
4. Bass, B. G., N. M. Buckley
Chloralose anesthesia in the dog: a study of drug
actions and analytical methodology
Am. J. Phys. 210, 854 - 862 (1966)
5. Bauer-Staeb, G., P. Niebes
The binding of polyphenols (Rutin and some of its
O-(beta-Hydroxyethyl)-Derivatives) to human serum proteins
Experientia 32, 367 - 369 (1976)
6. Baumann, J., F. v. Bruchhausen, G. Wurm
A structure-activity study on the influence of phenolic
compounds and bioflavonoids on rat renal prostaglandin
synthetase
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307,
73 - 78 (1979)

7. Beach, V. L., B. G. Steinetz
Quantitative measurement of Evans blue space in the
tissue of the rat:
Influence of 5-Hydroxytryptamine antagonists and
phenelzine on experimental inflammation
J. Pharmacol. 131, 400 - 406 (1961)
8. Bennet, J. P., B. D. Gomperts, E. Wollenweber
Inhibitory effects of natural flavonoids on
secretion from mast cells and neutrophils
Arzneim.-Forsch. 31 (3), 433 - 437 (1981)
9. Biesendorfer, H. D. Wildenauer, W. Felix
Protective effect of O-(beta-Hydroxyethyl)-rutosides
(HR) against the hemolytic action of various surface-active
substances in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311,
Suppl. 73 (1980)
10. Böhm, K.
Die Flavonoide
Eine Übersicht über ihre Physiologie, Pharmakodynamik
und therapeutische Verwendung
Editio Cantor KG, Aulendorf/Württ. (1967)
11. Bohr, D. F., B. Mc Ivor, J. F. Rinehart
The effects of various flavone glycosides on the rate
of passage of Evans blue through the damaged capillary
wall
J. Pharmacol. exp. Ther. 97, 243 - 249 (1949)
12. Brunner, U., A. Kappert, R. May, W. Schoop, E. Witzleb (Hrsg.)
Das dicke Bein
Huber 1970, Bern-Stuttgart-Wien

13. Bucklecke, E.
Chemie und Stoffwechsel des Venengewebes
Therapiewoche 26, 5088 - 5098 (1976)
14. Bundgaard, M.
Transport pathways in capillaries - in search of pores
Ann. Rev. Physiol. 42, 325 - 336 (1980)
15. Burg, M., N. Green
Effect of ethacrynic acid on the thick ascending
limb of Henle's loop
Kidney Int. 4, 301 - 308 (1973)
16. Capra, C.
Studio farmacologico e tossicologico di
componenti del *Ruscus aculeatus* L.
Fitoterapia 43, 99 - 113 (1972)
17. Casley-Smith, J. R., T. Bolton
Electron microscopy of the effects of histamine and
thermal injury on the blood and lymphatic endothelium,
and the mesothelium of the mouse's diaphragm, together
with the influence of Coumarin and Rutin
Experientia 29, 1386 - 1388 (1973)
18. Casley-Smith, J. R., N. B. Piller
The pathogenesis of oedemas, and the therapeutic action
of coumarin and related compounds
Folia Angiol. Supp. III, Symp. IV,
33 - 63 (1973)

19. Casley-Smith, J. R., E. Földi-Böresök, M. Földi
Fine structural aspects of lymphoedema in various
tissues and the effects of treatment with coumarin
and troxerutin
Br. J. exp. Path. 55, 88 - 93 (1974)
20. Casley-Smith, J. R., E. Földi-Böresök, M. Földi
A fine structural demonstration, that some
benzopyrones act as vitamin P in the rat
Am. J. Clin. Nutr. 28, 1242 - 1254 (1975)
21. Casley-Smith, J. R.
The actions of the benzo-pyrones on the
blood-tissue-lymph-system
Folia Angiol. 24, 7 - 22 (1976)
22. Casley-Smith, J. R.
Freeze-substitution of capillary endothelium:
the passage of ions and the artefactual nature of
"through-fare channels"
Microvasc. Res. 17, 8 (1979)
23. Casley-Smith, J. R.
Human trials of the benzo-pyrones in high-protein
oedemas
Folia Angiol. 4 - 6, 313 - 327 (1982/83)
24. Caujolle, F., P. Meriel, E. Stanislas
Sur les propriétés pharmacologiques de
l'extrait de Ruscus aculeatus L.
Ann. pharm. franc. 11, 109 - 120 (1953)

25. Cazenave, J. P., C. Klein-Soyer, C. Ebel, A. Beretz
Vascular endothelium, an important site of
blood-tissue exchanges
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983)
26. Chanal, J. L., H. Cousse, M. T. Sicart, B. Bonnaud, R. Marignan
Absorption and elimination of (^{14}C) hesperidinmethyl-
chalcone in the rat
Europ. J. of Drug Metabol. Pharmacokin. 6, 171 - 177 (1981)
27. Chanal, J. L., M. T. Mbatchi, M. T. Sicart, H. Sousse, F. Fauran
Bioavailability of a ^3H -labelled extract of *Ruscus*
aculeatus in rat as a function of the route of admini-
stration
zur Veröffentlichung in Arzneimittelforsch. (1982)
28. Charlier, R., A. Hosslet, M. Colot
Investigations expérimentales sur la fragilité vasculaire
Arch. int. Physiol. 71, 1 - 45 (1963)
29. Clough, G., C. C. Michel
The sequence of labelling of endothelial cell
vesicles with ferritin in the frog
J. Physiol. (Lond.) 292, 61 - 62 (1979)
30. Clough, G., C. C. Michel
The effect of temperature on the labelling of
endothelial cell vesicles with ferritin
Bibl. anat. 20, 278 - 280 (1981)

31. Coget, J. M., J. F. Merlen
Cyclo 3: Effets biomicroscopiques sur les
mésentère de grenouille
Angeiologie 32, 33 - 38 (1980)
32. Coget, J. M.
Interest of Cyclo 3 in the treatment of
venous insufficiency
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, vol. 2 (1983)
33. Crismon, J. M., R. R. Berez, J. D. Madden, F. A. Fuhrman
Rutin and other flavonoids as potentiators of terminal
vascular respons to epinephrine and as antagonists
of vasodepressor materials
Am. J. Physiol. 164, 391 - 398 (1951)
34. De Mey, J., P. M. Vanhoutte
Removal of endothelium and arterial reactivity
to acetylcholine and adenin nucleotides
Brit. J. Pharmacol. 72, 510 P (1981)
35. Dinya, Z., E. Hetényi
Relationship between the electronic structure and
biological action of some flavonoids
aus: Topics in flavonoid chemistry and biochemistry
Proceedings of the 4th Hungarian Bioflavonoid Symposium
Keszthely, 1973
36. Eriksson, E., B. Lisander
Low flow states in the microvessels of skeletal muscle
in cat
Acta Physiol. Scan. 86, 203 - 210 (1972)

37. Estler, C.-J.

Zur Pharmakologie der Bioflavonoide
Fortschr. Med. 89, 669 - 671 (1971)

38. Felix, W.

Strömungsmessung mit Thermistoren
Arch. exp. Path. Pharm. 244, 254 - 269 (1962)

39. Felix, W.

Über den Einfluß von IIR auf die Durchblutung
bei akuter venöser Stauung
Fortschr. Med. 86, 927 - 928 (1968)

40. Felix, W.

Wirkungsmechanismus der internen Therapie
mit Venopharmaka
Dtsch. med. J. 21, 456 - 466 (1970)

41. Felix, W.

Zur pharmakologischen Beeinflussung der
Extremitätenvenen
aus: Leu, H. J., Die Venenwand S. 112 - 115
Bern 1971

42. Felix, W., J. Remien, K. Hällfritsch

Zur Messung von Venenreaktionen im Tierversuch
Pflügers Arch. 329, 352 - 359 (1971)

43. Felix, W.

Zum Mechanismus der antiödematösen Wirkung von IIR
Dtsch. med. J. 23, 403 - 405 (1972)

44. Felix, W.

Medikamentöse Therapie bei venösen Abflußstörungen
Therapiewoche 32, 3366 - 3370 (1974)

45. Felix, W.

Pharmakologische Beeinflussung des Venentonus
Therapiewoche 26, 5099 - 5103 (1976)

46. Felix, W.

Zur Wirkung von O-(beta-Hydroxyethyl)-rutosiden auf die
Ödembildung durch Ethoxysklerol und Thiopental am
Hinterlauf der Katze
aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle
und klinische Ergebnisse
Hrsg.: Voelter, W., G. Jung, Springer 1978

47. Felix, W.

Medikamentöse Ödemtherapie bei venösen Abflußstörungen
Münch. Med. Wschr. 122, 819 - 820 (1980) a)

48. Felix, W.

Zum Problem "Venenmittel"
Med. Welt 31, 813 - 816 (1980) b)

49. Felix, W.

Zur Wirksamkeit von HIR bei peroraler Applikation
und zur Spezifität seiner protektiven Wirkung
Vortrag in Ludwigsburg 1982

50. Felix, W.

Measurement of venous tonus and of transcapillary fluid exchange during edema formation in hindleg of cats

aus: Proceedings of the international Symposium Vein and Microcirculation, Athen 1983

Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983) a)

51. Felix, W.

Anti-oedematous action of phlebodril^R and its tonicising effect of veins

aus: Proceedings of the international Symposium Vein and Microcirculation, Athen 1983

Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983) b)

52. Felix, W., J. Nieberle, G. Schmidt

Wirksamkeit von O-(beta-Hydroxyethyl)-rutosiden bei peroraler Applikation und Unspezifität ihrer protektiven Wirkung

aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside, neue Ergebnisse in Experiment und Klinik

Voelter, W., G. Jung (Hrsg.), Springer (1983) a)

53. Felix, W., J. Nieberle, G. Schmidt

Protektive Wirkung von Trimethylhesperidinhalcon und Ruscus aculeatus gegenüber dem Etacrynsäureödem am Hinterlauf der narkotisierten Katze

Phlebol. u. Proktol. 12, 209 - 218 (1983) b)

54. Felix, W.

Pharmacological models for the investigation of venotropic drugs

Inter. Angio. 3, 53 - 59 (1984)

55. Felix, W., G. Schmidt, J. Nieberle
Protective effect of Ruscus extract against injury
of vascular endothelium and vascular smooth muscle
caused by ethacrynic acid
Inter. Angio. 3, 77 - 79 (1984)
56. Felix, W.
Medikamentöse Therapie venöser Abflußstörungen
aus: Kompendium der Phlebologie
Die chronische Venen-Insuffizienz in Theorie und Praxis
Hrsg.: Schneider, W., J. Walker - München: Wolf 1984
57. Fewtrell, C. M. S., B. D. Gomperts
Effect of flavone inhibitors of transport ATPase
on histamine secretion from rat mast cells
Nature 265, 635 - 636 (1977)
58. Fischer, H., R. Rietsch, H. Kaiser
Zur Beeinflußbarkeit von Stauungsödemen durch Saluretika
Med. Welt 26, 1054 - 1055 (1975)
59. Fischer, H.
Möglichkeiten und Grenzen der medikamentösen Therapie
im phlebologischen Bereich
aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle
und klinische Ergebnisse, S. 161 - 168
Voelter, W., G. Jung (Hrsg.), Springer 1978
60. Fischer, H.
Sozioepidemiologische Studie über die Venenleiden bei
einer erwachsenen Wohnbevölkerung in der
Bundesrepublik Deutschland
aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside, neue Ergebnisse
in Experiment und Klinik, S. 121 - 134
Voelter, W., G. Jung (Hrsg.), Springer 1983

61. Földi, M., E. Földi-Börcsök
Lymphostase und Vitamine
Folia. Angiol. Suppl. III, 13 - 31 (1973)
62. Földi, M., J. R. Casley-Smith
The roles of the lymphatics and the cells
in high-protein oedemas
Molec. Aspects. Med. 2, 77 - 146 (1978)
63. Förster, H., M. Ziege
Zur intestinalen Resorption von Rutosiden
Fortschr. Med. 89, 672 - 675 (1971)
64. Förster, H.
Absorption and metabolism of flavonoids
aus: Topics in flavonoid chemistry and biochemistry
Proceedings of the 4th Hungarian Bioflavonoid Symposium
Keszthely, 1973
65. Forth, W., D. Henschler, W. Rummel
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
3. überarbeitete Auflage, BI - Mannheim, 1980
66. Frokjaer-Jensen, J., M. Bundgaard
Sessile vesicle "clusters" in frog mesenteric
capillaries. A new concept of vesicular
organization in the endothelial cell
Microvasc. Res. 18, 297 - 301 (1979)

67. Frøkjær-Jensen, J.

Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells.

An analysis by serial sectioning of frog mesenteric capillaries

J. Ultrastruct. Res. 73, 9 - 20 (1980)

68. Frömter, E., J. Diamond

Route of passive ion permeation in epithelia

Nature New Biol. 235, 9 - 13 (1972)

69. Furchgott, F. R., J. V. Zawadzki

The obligatory role of endothelial cells in

the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine

Nature 288, 373 - 376 (1980)

70. Gábor, M., A. Antal, Z. Dirner

Effect of hesperidin-methyl-chalcone on capillary resistance in the internal organs of the guinea pig and the rat

Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 34 (3), 221 - 226 (1968)

71. Gábor, M., A. Antal, K. Lipták, Ö. T. Zoltán, J. Györi, S. Benkő
Capillary resistance in the skin of rats fed flavone-free and atherogenic diets, and their response to hesperidin-methyl-chalcone

Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 38 (1), 71 - 75 (1970)

72. Gábor, M.

Pharmacologic effect of flavonoids on blood vessels

Symposia Angiologica Santoriana, 4th int. Symp.,
Fribourg-Nyon 1972

Angiologica 9, 335 - 374 (223 - 242) (1972)

73. Gábor, M., G. Blaszcó
Effekt von Rutosiden auf das Rattenpfoten-Ödem
aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle
und klinische Ergebnisse, S. 73 - 78
Hrsg.: Voelter, W., G. Jung, Springer 1978
74. Gábor, M.
Anti-inflammatory substances of plant origin
aus: Handb. Exp. Pharm. 50 II, 698 - 739 (1979)
75. Griffith, L. A.
The role of the intestinal microflora in
flavonoid metabolism
aus: Topics in flavonoid chemistry and biochemistry,
203 - 212
Proceedings of the 4th Hungarian Bioflavonoid Symposium
Keszthely, 1973, Ed. Farkas, Gábor, Kállay
76. Gross, F.
Unspezifische Beeinflussung entzündlicher Reaktionen
Schweiz. med. Wschr. 80, 697 - 701 (1950)
77. Gugler, R., H. J. Dengler
Inhibition of human liver Catechol-O-Methyl-transferase
by flavonoids
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
276, 223 - 233 (1973)
78. Gugler, R., M. Leschik, M. J. Dengler
Disposition of Quercetin in man after single oral
and intravenous dosis
Europ. J. clin. Pharmacol. 9, 229 - 234 (1975)

79. Hammersen, F., E. Möhring

Der Feinbau der Endstrombahn beim Dextran-Ödem
und deren Beeinflussung durch HR
Fortschr. Med. 86, 925 - 927 (1968)

80. Hammersen, F.

Zur Ultrastruktur der Wandveränderungen terminaler
Strombahnen bei verschiedenen experimentellen Ödemen
aus: Leu, Die Venenwand, 53 - 84, Bern 1971

81. Hammersen, F., E. Möhring

Zum Feinbau enzymatisch bedingter Endothel- und
Erythrozytenveränderungen (Phospholipase-Ödem)
und deren Beeinflussung durch HR
Dtsch. med. Wschr. 23, 406 - 409 (1972)

82. Hammersen, F.

The fine structure of different types of experimental
edemas for testing the effect of vasoactive drugs
demonstrated with an flavonoid
Symp. Angiol. Santoriana, 4th int. Symp.,
Fribourg-Nyon 1972
Angiologica 9, 326 - 354 (1972)

83. Hammersen, F.

Gefäßwand und Interstitium
Folia Angiol. Supp. III, Symposion IV
S. 268 - 278
Hrsg.: Comel, Klüken, 1973

84. Hammersen, F.

Zur Ultrastruktur experimenteller Ödeme und deren
Beeinflussung durch O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside
aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle
und klinische Ergebnisse
Hrsg.: Voelter, W., G. Jung, Springer 1978

85. Hammersen, F., U. Osterkamp-Baust
Die Schrankenfunktion des Endothels
Der Versuch einer kritischen Standortbestimmung
Phlebol. u. Proktol. 11, 1 - 8 (1982)
86. Hammersen, F., E. Hammersen
Zur Ultrastruktur des durch Etacrynsäure oder
Polidocanol hervorgerufenen Ödems und seine Beein-
flussung durch O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside
aus: O-(beta-Hydroxyethyl)-rutoside, neue Ergebnisse
in Experiment und Klinik
Voelter, W., G. Jung (Hrsg.), Springer 1983 a)
87. Hammersen, F., E. Hammersen
The structural reaction pattern of endothelial cells
to injurious stimuli
Agents and Actions 13, 442 - 450 (1983) b)
88. Harper, H. A., G. Löffler, P. E. Petrides, L. Weiss
Physiologische Chemie
Springer 1975, S. 764 - 765
89. Hauck, G.
Der Bindegewebsraum aus der Sicht der Lymphologie
Folia Angiol. 28, 200 - 202 (1980)
90. Hofmeister, A.
Vitamin P (Rutin) in Theorie und Praxis
Med. Welt 21, 502 - 507 (1970)
91. Janssens, W. J., T. J. Verbeuren, P. M. Vanhoutte
Effect of moderate cooling on adrenergic neuroeffector
interaction in canine cutaneous veins
Blood Vessels 18, 281 - 295 (1981)

92. Johansson, B. R.
Permeability of muscle capillaries to intestinal
microinjected ferritin
Microvasc. Res. 16, 362 - 368 (1978)
93. Joyce, C., M. Freund, R. N. Peterson
Contraceptive effects of intravaginal application of
acrosin and hyaluronidase inhibitors in rabbit
Contraception 19, 95 - 106 (1979)
94. Karnovsky, M. J.
The ultrastructural basis of transcapillary exchanges
J. Gen. Physiol. 52, 64s - 93s (1968)
95. Klemm, J.
Venenwirkung von Daflon^R
Münch. med. Wschr. 121 (26), 891 - 892 (1979)
96. Klemm, J.
Venöse Erkrankungen: Erfolgversprechende Therapie
mit Kombinationspräparat
Diagnostik 14, 392 - 396 (1981)
97. Klemm, J.
Strömungsgeschwindigkeit von Blut in varikösen Venen
der unteren Extremität
Einfluß eines Venentherapeutikums (Venostasin^R)
Münch. med. Wschr. 124 (23), 579 - 582 (1982)
98. Klüken, N.
Eine klinische Doppelblindstudie zum Versuch einer
Objektivierung der Therapie mit Venopharmaka
Therapiewoche 21, 72 - 78 (1971)

99. Klüken, N.
Die Bedeutung venolymphatischer Interrelationen
für die phlebologische Therapie
Phlebol. u. Proktol. 1, 125 - 134 (1972)
100. Križ, M.
Medikamentöse Verhütung des postischämischen Ödems
Vasa 4, 63 - 67 (1975)
101. Kuschinsky, G., W. Dupont, R. Hennes
Über den Einfluß des Rutins auf die Permeabilität
der Gefäße
Arch. exp. Path. Pharmacol. 207, 138 - 142 (1949)
102. Landis, E. M., J. R. Pappenheimer
Exchange of substances through the capillary walls
Handbook of Physiology, Sect. 2:
Circulation II, 961 - 964 (1963)
103. Lange, L., M. Echt
Vergleichende Untersuchungen über venentonisierende
Pharmaka
Fortschr. Med. 90, 1161 - 1164 (1972)
104. Laszt, L.
Zur Biochemie der Venenwand
aus: Leu, H. J.: Die Venenwand, S. 105 - 111
Bern 1971
105. Laszt, L.
Bases expérimentales pour une pharmacologie de
Flavonoides
Symp. Angiologica Santoriana, 4th int. Symp.
Angiologica 9, 193 - 203 (1972)

106. Laszt, I.
Die Biochemie und Pharmakologie der Venenwand
Therapiewoche 26, 5085 - 5086 (1976)
107. Lauressergues, H.
Expertise pharmacologique de Cyclo 3 gelules
(Interner Bericht, 1970)
(aus einer Mitteilung der Fa. Lipha über Phlebodril^R, 1982)
108. Lauressergues, H., P. Vilain
Pharmacological activity of Cyclo 3 on the
vascular smooth muscle
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2, 23 (1983)
109. Lecomte, J., A. Cession-Fossion
Sur les activités hypotensives des dérivés
O-Hydroxyéthylés au rutoside et leurs relations
avec les modifications de la perméabilité vasculaire
Arch. int. Physiol. 79, 981 - 991 (1971)
110. Lecomte, J., H. Van Cauwenberge, G. Lallemand
Sur l'œdème généralisé provoqué par les
rutosides chez le rat
C. R. Soc. Biol. 165, 2462 - 2464 (1971)
111. Lecomte, J., H. Van Cauwenberge
Le pouvoir amino-libérateur de quelques
bioflavonoïdes chez le rat
Symposia Angiol. Santoriana 4th int. Symp.
Angiologica 9, 311 - 325 (1972)

112. Lecomte, J., H. Van Cauwenberge
Sur quelques propriétés pharmacologiques du
mono (O-beta-Hydroxyethyl)-7-Rutoside chez le rat
Arch. Int. Pharmacodyn. 208, 317 - 327 (1974)
113. Lecomte, J.
Sur le pouvoir amino-libérateur des flavonoides
chez le rat
C. R. Soc. Biol. 177, 388 - 391 (1983)
114. Leu, H., J. Rüttner, A. Vogel, E. Grieshaber
Das Studium der Kapillaren am peritonealen Fremdkörper-
granulom (Ein neuer Modellversuch zum Studium vasoaktiver
Substanzen)
Zbl. Phlebol. 7, 60 - 71 (1968)
115. Leu, H. J.
Die Venenwand
Bern 1971
116. Le Veen, H. H., W. H. Fishman
Combination of Evans blue with plasmaprotein:
its significance of capillary permeability studies,
blood dye disappearance curves and its use as a protein tag
Am. J. of Physiol. 151, 26 - 33 (1947)
117. Lonati-Galligani, M., L. Galligani, G. C. Fuller
Effect of (+)-Catechin on purified prolylhydroxylase
and on collagen synthesis in skin fibroblasts in culture
Biochem. Pharmacol. 28, 2573 - 2578 (1979)
118. Manuel, M. A., M. W. Weiner
Effects of ethacrynic acid and furosemide on isolated
rat kidney mitochondria: inhibition of electron transport
in the region of phosphorylation site II
J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 209 - 221 (1976)

119. Manuel, M. A., M. W. Weiner
Effects of ethacrynic acid and furosemide on
phosphorylation reactions of kidney mitochondria
inhibition of the adenine nucleotide translocase
Biochim. Biophys. Acta 460, 445 - 454 (1977)
120. Marcelon, G., P. M. Vanhoutte
Proposed mechanism of action for Ruscus extract
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983)
121. Marcelon, G., T. J. Verbeuren, M. Lauressergues, P. M. Vanhoutte
Effect of Ruscus aculeatus on isolated canine
cutaneous veins
Gen. Pharmac. 14, 103 - 106 (1983)
122. Merlen, J. F., J. Coget
Bioflavonoide und Microzirkulation
Phlebol. u. Proktol. 4, 132 - 139 (1975)
123. Michel, C. C.
The investigation of capillary permeability
in single vessels
Acta Physiol. Scand. Suppl. 463, 67 - 74 (1979)
124. Michel, C. C.
Filtration coefficients and osmotic reflection
coefficients of the wall of single frog mesenteric
capillaries
J. Physiol. (Lond.) 309, 341 - 356 (1980)

125. Middleton, E. Jr., G. Drzewiecki
Effects of flavonoids and transitional metal cations
on antigen-induced histamine release from human basophils
Biochem. Pharmacol. 31, (7), 1339 - 1453 (1982)
126. Mikkelsen, E., O. Lederalle Pedersen
Regional differences in the response of isolated human
vessels to vasoactive substances
Gen. Pharmac. 14, 89 - 90 (1983)
127. Moore, D. H., M. Ruska
The fine structure of capillaries and small arteries
I. J. biophys. biochem. Cytol. 3, 457 - 462 (1957)
128. Moscarella, C.
Contribution a l'etude pharmacodynamique du
Ruscus aculeatus L. (Fragon épineux)
Thèse pour le doctorat de l'université
Toulouse, 1953
129. Müller, J.
Ruscus aculeatus L., ein neues Venentherapeutikum
Dtsch. Apoth.-Ztg. 113, 1370 - 1375 (1973)
130. Nedopil, N., W. Felix, J. Remien
Statische und dynamische Druck-Volumen-Beziehung
von Extremitätenvenen der Katze in vivo
Pflügers Arch. 349, 221 - 233 (1974)
131. Neumann-Mangoldt, P.
Erfahrungen in der Behandlung venöser Beinleiden
mit Essaven^R-Kapseln
Fortschr. Med. 97 (45), 2117 - 2120 (1979)

132. Nickel, R., A. Schummer, P. Seiferle
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere
Bd. III, S. 473 ff.
Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg, 1976
133. Niebes, P., L. Laszt
Influence in vitro d'une série de flavonoides sur
des enzymes du métabolisme des mucopolysaccharides de
veines saphènes humaines et bovines
Angiologica 8, 279 - 302 (1971)
134. Niebes, P.
Determination of enzymes and degradation products
of glycosaminoglycan metabolism in the serum of healthy
and varicose subjects
Clin. chim. Acta 42, 399 - 403 (1972)
135. Oschman, J. L.
Morphological correlates of transport
In: Membrane transport in biology
Hrsg.: Giebisch, G., D. C. Tosteson 3, 55 - 93
Heidelberg, Springer, 1978
136. Oustrin, J., M. J. Fauran, L. Conmanay
A pharmacokinetic study of ³H-diosmine
Arzneim.forsch. 27 (II), 1988 - 1991 (1977)
137. Palade, G. E., M. Simionescu, N. Simionescu
Structural aspects of the permeability of
the microvascular endothelium
Acta Physiol. Scand. Suppl. 463, 11 - 32 (1979)

138. Pappenheimer, J. R.
Passage of molecules through capillary walls
Physiol. Rev. 33, 387 - 423 (1953)
139. Pauschinger, P., M. Piechowiak, W. Schnizer, H. Hampel
Hämodynamische Effekte von Roßkastanienextrakt - eine
Studie an isolierten Gefäßstreifen, wachen Hunden und
am Menschen
Med. Welt 25, 603 - 608 (1974)
140. Pflug, J. J., L. M. Taylor
An experimental assessment of the action of a drug
for the swollen leg
Folia Angiol. 24, 72 - 79 (1976)
141. Piller, N. P.
Benzopyrone treatment of mild thermal oedema:
determination of the most effective doses
Arzneim. forsch. 27, 1138 - 1141 (1977)
142. Remien, J.
Aktive und passive Einflüsse vasoaktiver Pharmaka
auf Venen und den transkapillären Flüssigkeitsaustausch
Habilitationsschrift, München 1974
143. Remien, J., S. Silber, W. Felix
Venentonisierung durch Roßkastanienextrakt
Phlebol. u. Proktol. 3, 35 - 42 (1974)
144. Rothkopf, M., G. Vogel
Neue Befunde zur Wirksamkeit und zum Wirkungsmechanismus
des Roßkastaniensaponins Aescin
Arzneim.forsch. 26, 225 - 235 (1976)

145. Roztocil, K., J. Prerovský, J. Oliva
The effect of hydroxyethylrutosides on capillary
filtration rate in the lower limb of man
Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 435 - 438 (1977)
146. Rudofsky, G., F. Nobbe
Zur Wirkung eines Kombinationspräparates auf
die Venenkapazität
Fortschr. Med. 100, 1217 - 1220 (1982)
147. Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden
Springer, Berlin, 1971
148. Sannie, C., H. Lapin
V. Ruscogénine, 22'-alpha-spirosténe-3 beta-19-diol,
nouvelle sapogénine stérolique de Ruscus aculeatus L.
Bull. Soc. Chim. Fr. 1552 - 1555 (1955)
149. Schiller, A. A.
Mechanism of action of vitamin P flavonoid (Rutin)
on the cutaneous circulation
Am. J. Physiol. 165, 293 - 305 (1951)
150. Scheunert, A., A. Trautmann
Lehrbuch der Veterinär-Physiologie
S. 379 ff.
Verlag Paul Paray, Berlin u. Hamburg, 1976
151. Schneider, W., H. Fischer
Die chronisch-venöse Insuffizienz
Enke, Stuttgart 1969

152. Schwabe, K.-P., L. Flohé
Catechol-O-Methyltransferase, III.
Beziehungen zwischen der Struktur von Flavonoiden und
deren Eignung als Inhibitoren der Catechol-O-Methyl-
transferase
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 476 - 482 (1972)
153. Seidenberger, A. V., J. Müller, H. J. H. Heindl
Ein neues Venentherapeutikum
Therapiewoche 24, 867 - 881 (1974)
154. Sentou, Y.
Double blind study of Cyclo 3^R activity in man
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983)
155. Shepherd, J. T., P. M. Vanhoutte
The human cardiovascular system: facts and concepts
New York, Raven Press, 1979
156. Shepherd, J. T., N. J. Rusch, P. M. Vanhoutte
Effect of cold on the blood vessel wall
Gen. Pharmac. 14, 61 - 64 (1983)
157. Simionescu, N., M. Simionescu, G. E. Palade
Permeability of muscle capillaries to small hemepeptides.
Evidence for the existence of patent transendothelial
channels
J. Cell. Biol. 64, 586 - 607 (1975)

158. Simionescu, N., M. Simionescu, G. E. Palade
Structural basis of permeability in sequential
segments of the microvasculature of the diaphragm
II. Pathways followed by microperoxidase across
the endothelium
Microvasc. Res. 15, 17 - 36 (1978)
159. Simionescu, N.
The microvascular endothelium segmental differentiations
transcytosis; selective distribution of anionic sites
Adv. Inflammation Res. 1, 61 - 70 (1979)
160. Spector, W. G., D. A. Willoughby
Suppression of increased capillary permeability in
injury by monamine oxidase inhibitors
Nature 186, 162 - 163 (1960)
161. Svensjö, E.
Effects of O-(beta-hydroxyethyl)-rutoside (Hir) on
macromolecular permeability in the hamster cheek
pouch microvasculature
aus: New trends in venous diseases, S. 296 - 301
Bern 1977; Hrsg.: Kappert, A.
162. Tarayre, J. P., H. Lauressergues
Preuves pharmacologiques de l'activité
de l'héspéridine méthyl chalcone
Angéiologie 27, 197 - 203 (1975)
163. Tarayre, J. P., H. Lauressergues
Etude de quelques propriétés pharmacologiques d'une
association vasculotrope
Ann. pharm. franc. 34, 375 - 382 (1976)

164. Tarayre, J. P., H. Lauressergues
Advantages of a combination of proteolytic enzymes,
flavonoids and ascorbic acid in comparison with
non-steroid anti-inflammatory agents
Arzneim.forsch. 22 (1), 1144 - 1149 (1977)
165. Tarayre, J. P., H. Lauressergues
Action antioedémateuse d'une association enzymes
protéolytiques, flavonoides, hétérosides de Ruscus
aculeatus et acide ascorbique
Ann. pharm. franc. 37, 191 - 198 (1979)
166. Tesi, D., W. G. Forssmann
Permeability studies with the interstitial
tissue of the rat mesentery
II. Effect of a flavonoid on the permeability of
interstitial tissue
Pflügers Arch. 322, 188 - 191 (1971)
167. Thebault, J. J.
Auszug aus dem Abschlußbericht einer kontrollierten
Studie zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung
der Phlebodril-Kapseln (intern 1982)
168. Thebault, J. J.
Untersuchungen zur Wirkung eines Phlebotonikums
Fortschr. Med. 101, 1206 - 1212 (1983)
169. Thebault, J. J., c. Blatrix
Cyclo 3 clinical pharmacology
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. suppl. 3, Vol. 2 (1983)

170. Thulesius, O., Ph. D. Chairman
Present and future role of vasoactive drugs in
peripheral vascular disease
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983)
171. Trautwein, W., O. H. Gauer, H.-P. Koepchen
Herz und Kreislauf
aus: Physiologie des Menschen, Bd. 3
Hrsg.: Gauer, O. H., K. Kramer, R. Jung
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1972
172. Tschesche, R., G. Wulff
Konstitution und Eigenschaften der Saponine
Planta Med. 12, 272 - 292 (1964)
173. Van Cauwenberge, H., P. Franchimont
Action du Z 6000 (Trihydroxyethylrutoside) sur
divers tests d'inflammation expérimentale
réalisés chez le rat
Arch. int. Pharmacodyn. 170, 74 - 80 (1967)
174. Vanhoutte, P. M., W. J. Janssens
Local control of venous function
Microvas. Res. 26, 196 - 214 (1978)
175. Vanhoutte, P. M.
Effect of Ruscus heterosides on the isolated
canine saphenous vein
Interner Bericht v. Lipha 1981

176. Vanhoutte, P. M.

Control of vascular function - role of
the non-muscle components
Mayo Clinic Proceedings 57 (Suppl.), 20 - 27 (1982)

177. Vanhoutte, P. M.

Control of venous function
aus: Proceedings of the international Symposium
Vein and Microcirculation, Athen 1983
Inter. Angio. Suppl. 3, Vol. 2 (1983)

178. Vanhoutte, P. M., J. De Mey

Control of vascular smooth muscle function
by the endothelial cells
Gen. Pharmac. 14, 39 - 41 (1983)

179. Vanhoutte, P. M., J. T. Shepherd

Muscarinic and beta-adrenergic prejunctional
modulation of adrenergic neurotransmission in
the blood vessel wall
Gen. Pharmacol. 14, 35 - 37 (1983)

180. Vogel, G., H. Uebel

Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie
Arzneim.forsch. 10, 275 - 280 (1960)

181. Vogel, G., H. Ströcker

Die Wirkung von Pharmaka - insbesondere von
Flavonoiden und Aescin - auf den Lymphfluß und
die Permeabilität der intakten Plasma-Lymph-Schranke
von Ratten für Flüssigkeit und definierte Makromoleküle
Arzneim.forsch. 16, 1630 - 1634 (1966)

182. Webb-Peploe, M. M., J. T. Shepherd
Response of large hind limb veins of the
dog to changes in temperature
Circ. Rs. 22, 737 - 745 (1968)
183. Williams, T. J., J. Moreley
Prostaglandins as potentiators of increased
vascular permeability in inflammation
Nature 246, 215 - 217 (1973)
184. Yanase, M., Y. Orita, Y. Fukuhara, N. Okada, A. Ando, H. Abe
Effect of ethacrynic acid on mitochondrial electron
transport system and oxidative phosphorylation
Arzneim.forsch. 33, 120 - 124 (1983)

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med.
W. Felix für die Überlassung des Themas, vor allem aber für seine
freundliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Abfassung
der vorliegenden Arbeit.

Seine Assistentin, Frau Schneider sowie Frau Schubert und insbesondere
Frau Steigerwald haben mich bei Durchführung der Versuche und in
organisatorischen Aufgaben jederzeit unterstützt. Dafür bedanke ich
mich herzlich.

Lebenslauf

Josef Benedikt Nieberle

geboren am 14. Januar 1955

Eltern: Georg Nieberle

Adelheid Nieberle, geb. Freudling

Ausbildung

1961 - 1965 Volksschule in Frankenried

1965 - 1974 Staatliches Gymnasium Kaufbeuren

22.06.1974 Abitur

1974 - 1975 Wehrdienst

1975 - 1977 Studium der Geologie

1978 Beginn des Medizinstudiums

04.11.1983 Approbation als Arzt

Seit 01. Mai 1984 Assistenzarzt in der Anästhesie und Intensivmedizin
im Kreiskrankenhaus Memmingen.

In April 1980 begann ich mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation.

